

Rationelles Design und biomedizinische Anwendung von multifunktionalen Goldnanopartikel-Biokonjugaten

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften

– Dr. rer. nat. –

vorgelegt von

Lisa Gamrad

geboren in Wesel

Institut für Technische Chemie I
der
Universität Duisburg-Essen

2016

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von Oktober 2012 bis Dezember 2016 im Arbeitskreis von Prof. habil. Dr.-Ing. Stephan Barcikowski am Lehrstuhl für Technische Chemie I der Universität Duisburg-Essen angefertigt.

1. Gutachter: Prof. habil. Dr.-Ing. Stephan Barcikowski

2. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Wiebke Hansen

3. Gutachter: Prof. Dr. med. vet. Detlef Rath

Prüfungsvorsitzender: Prof. Dr. rer. nat. Malte Behrens

Tag der Disputation: 21.02.2017

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel

„Rationelles Design und biomedizinische Anwendung von
multifunktionalen Goldnanopartikel-Biokonjugaten“

selbst verfasst und keine außer den angegebenen Hilfsmitteln und
Quellen benutzt habe, und dass die Arbeit in dieser oder ähnlicher Form
noch bei keiner anderen Universität eingereicht wurde.

Essen, im Dezember 2016

Lisa Gamrad

Für René,
Helga, Klaus,
Dennis und Anna

*Auch eine Enttäuschung, wenn
sie nur gründlich und endgültig
ist, bedeutet einen Schritt
vorwärts.*

Max Planck

Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle bei all' den Menschen bedanken, die mich während meiner gesamten Promotionszeit begleitet haben und mich während der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt haben.

Zunächst möchte ich mich herzlich bei meinen Doktorvater Prof. habil. Dr.-Ing. Stephan Barcikowski für die Möglichkeit bedanken, meine Doktorarbeit in seinem Arbeitskreis durchzuführen. Ich danke ihm für die interessante Themenstellung, die zahlreichen intensiven Gespräche, welche mich immer vorangetrieben haben, sowie die vielen Möglichkeiten, die ich für meine wissenschaftliche Entwicklung wahrnehmen durfte.

Mein aufrichtiger Dank geht auch an Prof. Dr. rer. nat. Wiebke Hansen für die Übernahme des Korreferats. Darüber hinaus möchte ich ihr für die überaus spannende Kooperation, die intensive Zusammenarbeit sowie für die unkomplizierte und positive Stimmung danken.

Mein geschätzter Dank geht außerdem an Prof. Dr. med. vet. Detlef Rath für die Übernahme des dritten Gutachterpostens. Ich möchte mich außerdem für die gute Zusammenarbeit und Stimmung bei der Bearbeitung des immer spannend gebliebenen Projekts bedanken.

Ich möchte mich auch bei der Deutschen Forschungsgesellschaft für die Förderung meines Hauptprojekts (BA3580/10) bedanken.

Im Folgenden möchte ich außerdem meinen weiteren Projektpartnern für die gute Zusammenarbeit danken.

Hierbei geht ein besonderer Dank an die Mitarbeiter des Friedrich-Loeffler-Instituts in Mariensee unter der Leitung von Detlef Rath. Ich danke Ulrike Taylor, Roberto Mancini, Daniela Tiedemann, Sabine Klein und Wilfried Kues für die intensive Zusammenarbeit, die tollen fruchtbaren Projekttreffen, die vielen Telefonate und die sicher unterstützend wirkende super Stimmung während unserer Zusammenarbeit.

Ein weiterer Dank geht an Prof. Dr. Alexander Heisterkamp und Judith Krawinkel vom Institut für Angewandte Optik der Friedrich-Schiller-Universität Jena (jetzt Leibniz Universität Hannover) für die gute Zusammenarbeit während unserer Kooperation und die vielen intensiven Telefonate mit Judith.

Schließlich möchte ich auch Prof. Dr. Mathias Ulbricht und Nkem Alele von der Technischen Chemie II der Universität Duisburg-Essen für die erfolgreiche Kooperation danke.

Ein großer Dank geht an all' diejenigen, die diese Arbeit und die Daten dazu erst ermöglicht haben. Ich danke Jurij Jakobi (TCI, UDE) für die Durchführung von TEM-Messungen, Anthony Squire und Alexandra Brenzel (IMCES, Uniklinik Essen) für die beratende Unterstützung bei konfokalmikroskopischen Analysen und FLIM-Messungen, Ulrich Hagemann (ICAN, UDE) und Sven Reichenberger (TCI, UDE) für die Durchführung von XPS-Messungen und schließlich danke ich auch Steffen Franzka (ICAN, UDE) für die Durchführung von AFM-Messungen an Spermien.

Ich danke außerdem meinen Studenten, deren Abschlussarbeiten, Praktika und Hiwi-Zeiten ich betreuen durfte: Olga Bachtagarew, Jieqing Huang, Jens Schumacher, Ludmilla Langolf, Martina Pantaler, Nikolai Thiel, Rosa van Vlodrop, Sneha Suresh, Anh Van Le, Janina Brückerhoff, Alwina Dell, Alexander Heinemann und Dario Becker. Ein ganz besonderer Dank geht hier jedoch an Anna Ziefuß, die mir eine langjährige Begleiterin war und mich mit Experimenten und Diskussionen tatkräftig unterstützt hat.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinen lieben Arbeitskollegen von der Technischen Chemie I (Universität Duisburg-Essen) bedanken. Dank euch waren schlechte Ergebnisse leichter zu ertragen und die Tage schienen kürzer als sie wirklich waren. Danke für die vielen Diskussionen (nicht nur im Gruppenseminar), die gegenseitige Unterstützung, die vielen schönen Freizeitveranstaltungen und das gegenseitige Miteinander.

Danke insbesondere an Christoph Rehbock, der mir als Gruppenleiter oft hilfreiches Feedback und Unterstützung gegeben hat sowie bei Diskussionsbedarf zur Stelle war.

Vielen Dank an Claudine Florian, die mir den Start in den Tag oft durch ein kleines, fröhliches Pläusch'chen vereinfacht hat.

Ein großer Dank geht an Dieter Jacobi, den besten WG-Mitbewohner der Welt. Du hast mir die Zeit wirklich versüßt, und das nicht nur wegen der ständig vollen Keksdose.

Schließlich möchte ich insbesondere Nina Million, Sven Koenen, Carmen Streich und Jurij Jakobi einen ganz großen Dank für die gegenseitige Unterstützung, die vielen Gespräche und das gegenseitige Vollnölen (manchmal muss auch das mal sein) aussprechen.

Ich danke meinen Freunden und meiner Familie für die Unterstützung, die sie mir jederzeit geben und die es mir möglich gemacht hat, so weit zu kommen. Danke auch für die vielen, willkommenen Ablenkungen abseits des Labors und des Schreibtisches.

Insbesondere danke ich meinen Eltern, ohne die ich nicht der Mensch wäre, der ich heute bin. Danke für alles. Danke Dennis und Anna, dass ihr immer für mich da seid.

Mein allergrößter Dank geht an René. Danke für deine Ruhe und, dass Du mich seit Beginn an immer unterstützt, meine Launen erträgst und mich aufbaust, wenn es nötig ist. Ohne dich wäre ich nicht so weit gekommen, zumindest nicht mit einem Lächeln im Gesicht.

Inhaltsverzeichnis

Kurzzusammenfassung	XI
Summary	XII
1. Einleitung.....	1
2. Zielsetzung	4
3. Theoretische Grundlagen	6
3.1. Physikalisch, chemisch und biologisch relevanter Einsatz von Bionanogold	6
3.2. Plasmonische Goldnanopartikel	10
3.3. Biologische Funktionsmoleküle.....	24
3.4. Adsorptionsprozesse auf Nanopartikeln	30
3.5. Biofunktionalisierung von lasergenerierten Goldnanopartikeln und ihre Verwendung	34
4. Ergebnisse und Diskussion	38
4.1. Synthese und Größenkontrolle ligandenfreier Goldnanopartikel.....	39
4.2. Variation des Ligandentyps: Einfluss verschiedener Faktoren auf die Partikeleigenschaften und Oberflächenbeladung von Goldnanopartikel-Biokonjugaten	50
4.2.1. Einfluss von Salzen und kleinen Molekülen auf Goldnanopartikel.....	50
4.2.2. Einfluss von Peptiden auf Goldnanopartikel-Konjugate.....	65
4.2.3. Methoden zur Aufreinigung und Bestimmung der Oberflächenbeladung von Biokonjugaten.....	72
4.2.4. Einfluss von Oligonukleotiden auf Goldnanopartikel-Konjugate	89
4.2.5. Einfluss von Peptiden auf Goldnanopartikel-Oligonukleotid-Konjugaten	105
4.2.6. Einfluss von Biomolekülen auf mit Salz behandelte Goldnanopartikel-Konjugate	115
4.3. Biologische Anwendungen von multifunktionalen Goldnanopartikel- und Goldnanocluster-Konjugaten	126
4.3.1. Auswahlkriterien zum Design der Goldnanopartikel-Biokonjugate für biomedizinische Anwendungen	127
4.3.2. Prüfung der Kompatibilität der Konjugate für biologische Anwendungen	133
4.3.2.1. Stabilität von Goldnanopartikel-LNA-Konjugaten	133
4.3.2.2. Hybridisierung von AuNP-LNA-Konjugaten an synthetische ssDNA und dsDNA-Proben	138
4.3.3. Analyse der Wechselwirkungen von Goldnanopartikel-Konjugaten mit Rinderspermien	145
4.3.4. Analyse der Aufnahmefähigkeiten von Goldnanopartikel-Konjugaten in regulatorischen T-Zellen und deren Nutzung zur Transfektion..	172
4.3.5. Endosomale Aufnahme und gezielte Freisetzung von Goldnanopartikel-Konjugaten.....	180
5. Zusammenfassung.....	191
6. Literaturverzeichnis	197
7. Anhang.....	226

7.1. Material und Methoden	226
7.1.1. Analytische Methoden	226
7.1.1.1. Kolloidanalyse	226
7.1.1.2. Bindungs-Assays	230
7.1.1.3. Bildgebung	231
7.1.2. Analysengeräte	233
7.1.3. Verwendete Materialien.....	234
7.2. Experimentelle Durchführung	239
7.2.1. Herstellung ligandenfreier Goldnanopartikel	239
7.2.2. Funktionalisierung von Goldnanopartikeln	240
7.2.2.1. Nanopartikel-Funktionalisierung mit Oligonukleotiden	240
7.2.2.2. Nanopartikel-Funktionalisierung mit Peptiden, anderen Thiol- Liganden oder Anionen.....	242
7.2.3. Vorbereitung der Proben zur Charakterisierung der Goldnanopartikel- Konjugate	244
7.2.3.1. Herstellung der Pufferlösungen.....	244
7.2.3.2. Stabilitätsuntersuchungen in biologischen Puffern.....	245
7.2.3.3. Probenpräparation zur TEM-Analyse	245
7.2.4. Biologische Assays	245
7.2.4.1. Durchführung der Analyse der Hybridisierungseigenschaften von Goldnanopartikel-LNA-Konjugaten	245
7.2.4.2. Experimente zur Analyse der Penetrationseigenschaften von Goldnanopartikel-Konjugaten	247
7.3. Abkürzungsverzeichnis	252
7.4. Variablen.....	253
7.5. Formelverzeichnis.....	253
7.6. Abbildungsverzeichnis	254
7.7. Tabellenverzeichnis	266
7.8. Ergänzende Graphiken zum Kapitel Ergebnisse und Diskussion	267
7.9. Lebenslauf	334
7.10. Publikationsliste	335

Kurzzusammenfassung

Goldnanopartikel-Biokonjugate stellen ein weit verbreitetes Werkzeug für biologische Anwendungen dar. Jedes biologische System und die damit verbundene Anwendung wie die medizinische Diagnostik, Therapie oder auch die biologische Bildgebung beruhen auf unterschiedlichen Faktoren, welche die experimentellen Rahmenbedingungen festlegen. Auch das Design der zu verwendenden Nanopartikel-Konjugate muss an die Anwendung angepasst werden. Oft sind mehrere Funktionen wie das Eindringen in die Zelle, der gezielte Transport von Funktionsmolekülen oder eine gezielte Nanopartikelansammlung notwendig. Hierbei sind lasergenerierte Goldnanopartikel von Vorteil. Sie haben eine ligandenfreie Oberfläche und potentiell toxische Substanzen, wie sie in der chemischen Synthese eingesetzt werden, können ausgeschlossen werden. Weiterhin begünstigt dies eine hohe Oberflächenbeladung, was insbesondere für multifunktionale Nanopartikel vorteilhaft ist.

In dieser Arbeit wurde der Einfluss von verschiedenen Liganden wie Oligonukleotiden, zellpenetrierenden Peptiden und Liponsäure auf monofunktionalen und multifunktionalen Goldnanopartikeln untersucht. Hierbei konnten optimale Bedingungen zur Herstellung monomodaler, monodisperser Goldnanopartikel, welche als ligandenfreie Plattform für die Biokonjugation dienen, ermittelt werden. Darüber hinaus wurden charakteristische Parameter bezüglich der Stabilität und Oberflächenbeladung der Konjugate analysiert, welche im weiteren Verlauf zum Design spezifischer Konjugate genutzt wurden.

Schließlich erfolgte der Einsatz der hergestellten Konjugate, welche als Einzelpartikel oder Agglomerat vorlagen, in biologische Anwendungen mit Rinderspermien, regulatorischen T-Zellen und Krebszellen. Hierbei wurde die Anlagerung und Penetration von Goldnanopartikeln auf und in Spermien erfolgreich gezeigt. Des Weiteren erfolgte das erfolgreiche Einbringen eines Funktionsmoleküls in T-Zellen und die gezielte laserinduzierte Freisetzung von Einzelpartikeln, welche als Agglomerat eingesetzt wurden, in das Zytoplasma von Krebszellen.

Summary

Gold nanoparticle bioconjugates are a wide spread tool for biological applications like medical diagnostic, therapy or bioimaging. Biological systems are based on various parameters which influence the experimental conditions. Hence, the design of nanoparticle bioconjugates has to be assessed according to the bioapplication. Aspects like cell penetration, drug delivery or selective nanoparticle accumulation need to be achieved. For this purpose, laser-generated gold nanoparticles are advantageous due to a ligand-free surface and no potentially toxic ligands which are used during chemical synthesis. Additionally, a higher surface coverage can be achieved with these nanoparticles possessing an optimal platform for multifunctional conjugates.

In this study, the influence of different ligands like oligonucleotides, cell penetrating peptides or lipoic acid on monofunctional and multifunctional conjugates was investigated. In this context, ideal conditions regarding synthesis of monomodal and monodisperse gold nanoparticles were determined. These particles were meant to be used as a ligand-free platform for bioconjugation. Furthermore, characteristic parameters concerning stability and surface coverage of the conjugates were carried out. Based on these parameters a specific design for gold nanobioconjugates was established.

Finally, the conjugates were used as single particles and agglomerates during biological experiments with bovine sperm, murine regulatory T cells and cancer cells. The attachment and penetration of gold nanoparticles on and into sperm was shown to be successful in this study. Additionally, the transport of functional molecules into regulatory T cells was achieved. The targeted release into the cytoplasm of a cancer cell of single nanoparticles which were applied before as agglomerates was aimed as well.

1. Einleitung

Seit Jahrhunderten wird makroskopische Gold in der Medizin eingesetzt [1] und kommt heutzutage in seiner nanoskaligen Form bereits in klinischen Studien zum Einsatz. [2, 3, 4] Goldnanopartikel-Konjugate stellen ein zunehmend wichtiges Forschungsfeld im Bereich der Lebenswissenschaften dar. Die Anzahl der Zitationen von Publikationen über funktionalisierte Goldnanopartikel, welche für medizinische und biologische Anwendungen verwendet werden, lag im Jahr 2015 bei 63.756 und ist in den letzten 7 Jahren stetig angestiegen. [5]¹ Dies, in Verbindung mit der hohen Anzahl an seit 2000 bis heute veröffentlichten Arbeiten über Goldnanopartikel-Konjugate von 940.295, spiegeln die Aktualität dieses Forschungsgebiets wieder. [5]²

Dieses große Interesse an funktionalisierten Goldnanopartikeln ist unter anderem auf ihre einzigartigen Eigenschaften zurückzuführen. Hierzu zählen die Oberflächenplasmonenresonanz [6], aufgrund dessen Gold unter anderem in Bioassays weit verbreitet eingesetzt wird [6], die Biokompatibilität [7, 8, 9] und ihre Affinität zu Elektronendonatoren wie Thiol-Gruppen [10], die eine kovalente Funktionalisierung der Partikel ermöglicht.

Aufgrund dieser Merkmale besteht eine hohe Anzahl an unterschiedlichen Goldnanopartikel-Konjugaten, welche die verschiedensten Oberflächenmoleküle haben und damit in unterschiedlichen Anwendungen eingesetzt werden können. Für die Partikelmodifikation werden Salze wie Trinatriumcitrat [11], kleine Moleküle wie Liponsäure [12, 13, 14] sowie Oligonukleotide [11, 15, 16], Peptide [11, 17, 18] und Polymere [6] eingesetzt.

Die Variationsmöglichkeiten der Oberflächenliganden ermöglicht einerseits den Einsatz in zahlreichen medizinisch-biologischen Anwendungen, wobei die Konjugate als multifunktionelle Substanzen wirken können. Andererseits erfordert die Anwesenheit verschiedener Funktionsmoleküle eine genaue Analyse, um Wechselwirkungen der Liganden untereinander und Kreuzeffekte auszuschließen. Ferner muss sichergestellt werden, dass die Funktion der Liganden nicht eingeschränkt ist. Aus diesem Grund ist das präzise Design der Goldnanopartikel-

¹ Für diese Angabe wurden die folgenden Suchworte bei „Web of Science“ eingegeben: AuNP, functional*, Adsorption, ligand, shell, conjugat* +biomedical application, biology, medicine.

² Für diese Angabe wurden die folgenden Suchworte bei „Web of Science“ eingegeben: AuNP, functional*, Adsorption, ligand, shell, conjugat*.

Konjugate wichtig, um speziell auf die Anwendung angepasste und damit optimal wirksame Konjugate zur Verfügung stellen zu können.

Die zwei Anwendungsfelder der optischen Markierung und der gezielten Molekülfreisetzung sind für den Verlauf der Arbeit relevant. Mit Hilfe spezifisch bindender Liganden ist es möglich, die Konjugate an bestimmte Stellen im Inneren von Zellen zu binden, um diese zu markieren. Die Markierung kann anhand der Plasmonenresonanz oder der Partikelstreuung detektiert werden. [6, 19, 20, 21, 22] Weiterhin können die Nanopartikel zusätzlich als Trägersysteme genutzt werden, um beispielsweise medizinische Wirksubstanzen in das Innere von Zellen zu bringen, damit diese räumlich begrenzt wirken können. Mit Hilfe von zielgerichteten Liganden kann eine spezifische Aufnahme der Nanopartikel-Konjugate erreicht werden. [6, 23, 24, 25]

Bisher wird ein Großteil dieser Experimente mit chemisch hergestellten Goldnanopartikeln durchgeführt. Hierbei besteht jedoch der Nachteil, dass Reduktionsmittel und Stabilisatoren auf der Oberfläche der Partikel verbleiben. [26] Diese Substanzen rufen zum Teil toxische Effekte hervor und erschweren somit den Einsatz in biomedizinischen Experimenten. [27] Weiterhin sind systematische Untersuchungen der Oberflächenfunktionalisierung und der daraus resultierenden Eigenschaften der Konjugate erschwert, da aufgrund des Ligandenaustausches [15] einerseits die Oberflächenbeladung schwer zu kontrollieren ist und andererseits die auftretenden Effekte nur indirekt den unterschiedlichen Liganden zugeordnet werden können. Demzufolge sind ungewollte Mischungen aus Funktionsliganden und Stabilisatoren auf der Oberfläche und somit auch ungewollte Effekte ein weiteres Problem, insbesondere in biomedizinischen Anwendungen.

Eine Alternative für das Bereitstellen eines variablen Ausgangssystems und damit eine Basis für die Anbindung verschiedener Funktionsmoleküle, stellen insbesondere lasergenerierte Goldnanopartikel dar. Diese sind frei von unerwünschten Liganden und haben eine nackte Partikeloberfläche. [15] Die Partikel können somit entsprechend der gewünschten Funktion für die Anwendung angepasst werden. Schließlich können unter Verwendung dieser Partikel bei der Untersuchung der Konjugate Kreuzeffekte mit Stabilisatoren oder anderen Rückständen, wie sie beispielsweise in der chemischen Synthese vorkommen, ausgeschlossen werden und die auftretenden Effekte bestmöglich eingestuft werden.

Die Biofunktionalisierung von lasergenerierten Goldnanopartikeln wird seit 2007 erforscht [28] und hat sich seitdem stetig weiterentwickelt. Der erste Ansatz zur Funktionalisierung der Partikel ist die *In-situ*-Konjugation, bei der die Liganden in das Abtragsmedium gegeben werden und in Anwesenheit der Liganden die laserbasierte Partikelherstellung durchgeführt wird. [29, 30, 31] Vorteilhaft an dieser Methode ist die einfache Durchführung in nur einem Schritt [29] und die Reduktion der Partikelgröße. [30] Hierbei werden bereits funktionale Liganden wie Oligonukleotide [15, 29, 30, 31] und Peptide [17] genutzt. Darüber hinaus ist diese Vorgehensweise verändert und optimiert worden, indem beispielsweise eine Durchflussskammer statt eines Satzreaktors verwendet [32] und die Konjugation dadurch verzögert („*fast ex situ*“, „*ex situ*“) [10, 18] durchgeführt worden ist. Ziel ist hierbei unter anderem die Degradation der Liganden durch die Laserstrahlung zu verhindern.

Überdies existieren auch Untersuchungen zur Konjugation, wobei der Einfluss von Abstandshaltern [33] oder des pH-Wertes [17] auf die Konjugationseffizienz thematisiert werden. Auch erste Veröffentlichungen zu der Oberflächenbedeckung dieser Goldnanopartikel [15] und zu bifunktionalen Konjugaten auf Basis der ligandenfreien Goldnanopartikel sind zu finden. [10]

Trotz der Optimierung des *In-situ*-Konjugationsverfahrens besteht bei diesem Herstellungsprozess die Problematik, dass die Partikelgröße mechanistisch mit der Oberflächenbedeckung in Relation steht. [30] Dadurch ist es schwierig, diese beiden Parameter unabhängig voneinander einzustellen.

Während der Einsatz von Goldnanopartikeln und ihren Konjugaten in biologischen Experimenten beispielsweise zur Aufnahme in Zellen durch chemisch hergestellte Partikel bereits weit verbreitet ist, ist trotz der offenkundigen Vorteile die Verwendung von ligandenfreien Partikeln, welche durch die junge Methode der Laserablation in Flüssigkeiten hergestellt werden, wenig untersucht. Diese Partikel sind jedoch bereits zur Verbesserung der Transfektionseffizienz in Standardprotokollen eingesetzt worden. [34, 35] Weiterhin ist die Aufnahme in menschliche Brustkrebszellen [36] sowie in bovine Endothelzellen [37, 38] zu erwähnen. Schließlich ist die Idee der nanopartikelbasierten Zellsortierung von Säugetierspermien formuliert worden, um das bereits industriell in großem Maßstab bestehende und auf einem UV-Farbstoff basierende Trennverfahren zu optimieren. [39]

2. Zielsetzung

In dieser Arbeit werden die bereits bestehenden Erkenntnisse zur Synthese von Goldnanobiokonjugaten auf Basis von lasergenierten Goldnanopartikeln zu Grunde gelegt und um die Entwicklung definierter Konjugatsysteme erweitert. Hierbei soll der zuvor einstufige Prozess der *In-situ*-Konjugation in zwei Prozesse aufgesplittet werden, die Herstellung von Goldnanopartikeln und deren *Ex-situ*-Biokonjugation. Das Ziel dieser Strategie ist die Entwicklung eines Systems, mit dem Konjugate individuell und mit definierten Eigenschaften, passend für künftige biomedizinische Anwendungen, hergestellt werden können. Der Vorteil eines zweistufigen Verfahrens ist zum einen, dass die Größe der Partikel unabhängig von der Ligandenbelegung eingestellt werden kann und die Partikeleigenschaften zunächst separat von denen der späteren Konjugate ermittelt werden können. Zum anderen kann die Oberflächenbedeckung der zuvor charakterisierten Partikel besser untersucht und kontrolliert werden, ebenso wie der Einfluss des Ligand/NP- und, bei multifunktionalen Konjugaten, des Ligand/Ligand-Verhältnisses. Im Hinblick auf den Einsatz in biologischen Anwendungen ist mit dieser Vorgehensweise auch immer eine Kontrolle ohne Liganden vorhanden, welche die gleichen Eigenschaften besitzt wie das Ausgangsmaterial der Konjugate. Dies ist bei der *In-situ*-Konjugation nicht gegeben.

Das Ziel der Arbeit ist daher die Entwicklung eines Modellsystems zur Analyse der durch verschiedene Liganden auftretenden Effekte und Auswirkungen auf die resultierenden Biokonjugate, welche schließlich in biomedizinischen Anwendungen eingesetzt werden sollen.

Bei der *Ex-situ*-Biokonjugation in der vorliegenden Arbeit sollen lasergenerierte Goldnanopartikel als Plattform für die Anbindung verschiedener Liganden zur Herstellung von mono- und multifunktionaler Konjugate eingesetzt werden. Hierbei soll der Einfluss von Salzen, kleinen Molekülen mit ~200 Da, Oligonukleotiden und Peptiden auf die resultierenden Konjugate umfassend bezüglich Stabilität, Ladung und Oberflächenbeladung untersucht werden, wobei immer die Ligandendosis auf den Nanopartikeln variiert wird. Des Weiteren sollen optimale Konjugationsparameter bei der Funktionalisierung mit beispielsweise Oligonukleotiden ermittelt werden und verschiedene Aufreinigungsmethoden zur Entfernung ungebundener Liganden untersucht werden.

Schließlich sollen Konjugate spezifisch für drei exemplarische biomedizinische Anwendungen hergestellt und auf ihre Funktionalität für die Anwendungen, in denen sie anschließend eingesetzt werden, untersucht werden. Bei den Anwendungen handelt es sich einerseits um die Penetration von Bullenspermien und die Y-Chromosom-spezifische Hybridisierung an genomischer DNA dieser Spermien. Hierbei ist das Kernkriterium Biokonjugate als Einzelpartikelkonjugat herzustellen und zudem die Eigenschaften der Penetration und spezifischen Hybridisierung zu verknüpfen.

Andererseits sollen regulatorische T-Zellen mit Hilfe von trifunktionalen Konjugaten erfolgreich penetriert und transfiziert werden. Auch hier ist das Zusammenspiel von drei Liganden auf einem Partikel maßgebend für den Erfolg des Experiments.

Anhand einer Krebszelllinie wird außerdem die Möglichkeit der gezielten intrazellulären laserinduzierten Freisetzung von Primärpartikeln gezeigt, welche zuvor als Agglomerat endosomal in die Zellen aufgenommen worden sind.

3. Theoretische Grundlagen

3.1. Physikalisch, chemisch und biologisch relevanter Einsatz von Bionanogold

Die Einsatzmöglichkeiten von Nanopartikeln und modifizierten nanopartikulären Formulierungen sind weitreichend und lagen 2013 vorrangig in den industriellen Bereichen der Elektronik, Medizin und Pharma sowie der Automobilbranche. [40] In der Forschung liegt der Schwerpunkt der Nanotechnologie in erster Linie in dem Sektor Medizin und Pharma. An zweiter Stelle liegen die Bereiche der Elektronik und Energie. [40] In beiden Zweigen ist der medizinische Bereich bei der Anwendung von Nanopartikeln führend, dies verdeutlicht die Relevanz dieser Materialien. Im Folgenden steht die medizinische und biologische Anwendung von Nanopartikeln, im Speziellen von Bionanogold, im Vordergrund. Unter Bionanogold wird in dieser Arbeit ein Goldnanopartikelkolloid verstanden, welches entweder mit biologisch relevanten Funktionsmolekülen (z.B. DNA, Peptide) modifiziert ist oder eine unspezifische Oberflächenbedeckung (Z.B. Trinatriumcitrat, Liponsäure) besitzt. Zudem soll das funktionalisierte Kolloid die Kriterien der Biokompatibilität erfüllen. Die Vorteile von Gold im Vergleich zu anderen Materialien sind im folgenden Kapitel 3.2 näher erläutert.

Der Einsatz von Goldnanopartikeln zur Therapie und Diagnostik verschiedener Krankheiten deckt einen großen Bereich der Forschung mit diesen Partikeln ab. Hierbei werden unterschiedliche Verfahren wie die optische Sensorik und Bildgebung, Medikamententransport, die gezielte Pharmakotherapie oder die photothermische Therapie verwendet. Weiterhin ist die Untersuchung der Nanopartikel auf ihre Toxizität ein wichtiger Aspekt dieser Forschung [26], worauf im nächsten Kapitel eingegangen wird.

Die optische Sensorik und Bildgebung profitiert bei der Nutzung der Goldnanopartikel von ihren einzigartigen optischen Eigenschaften, wie der Plasmonenresonanz, welche der Grund für die rote Farbe des Kolloids ist. Bei der Verwendung von kleinen Nanopartikeln im Subnanometerbereich, den Clustern, stellt die Fluoreszenz ein signifikantes Merkmal dar. Die Sensorik mittels fluoreszierender Goldcluster kann durch An- oder Ausschalten der Fluoreszenz erfolgen. So können diese als Sensoren für Proteasen dienen, welche die für die Fluoreszenz notwendige Ligandenhülle abbauen. Dadurch erfolgt ein Ausschalten der Fluoreszenz. [41] Das Anschalten hingegen erfolgt über eine Verstärkung der Fluoreszenz durch beispielsweise

Glutathion auf Histidin-funktionalisierten Nanopartikeln. [42] Unter Verwendung der Plasmonenresonanz von größeren Nanopartikeln wird eine Verschiebung der Plasmonenresonanz-Bande genutzt, welche gemeinsam mit der farblichen Änderung des Kolloids von Rot zu Blau oder umgekehrt auftritt. Eine verlässliche Methode ist hierbei die Verwendung von Oligonukleotiden, welche über Hybridisierung, der Bindung zwischen zwei Oligonukleotid-Strängen, zu einem Zusammenlagern der Nanopartikel (Agglomeration) und so zu einer Verschiebung der Plasmonenresonanz führt. [19, 20, 21, 22] Dies kann für den spezifischen Nachweis von Oligonukleotiden ausgenutzt werden. [21, 43, 44] Goldnanopartikel als Sensoren werden außerdem bereits in kommerziell erhältlichen Schnelltests in Form von Streifentests, im Englischen auch Lateral Flow-Assay genannt, verwendet. Beispiele hierfür sind der Schwangerschaftstest (FirstResponse™) [45], Schnelltests auf pathogene Toxine (Duopath®) zur Detektion von Legionellen oder E. coli Bakterien [6] sowie auch Immunassays (ImmunoCAP®) für die Bestimmung von Allergenen. [46] Für diese Produkte werden gegenwärtig aufgrund der etablierten Synthesemethoden ausschließlich Goldnanopartikel aus der chemischen Synthese genutzt.

Bezogen auf die Bildgebung können Goldnanopartikel innerhalb von biologischen Proben aufgrund ihrer 10^5 - 10^6 -fach höheren Leuchtkraft als von Fluoreszenzfarbstoffen verwendet werden. [47, 48] Dies beruht neben dem hohen Streuquerschnitt [47, 48] auf dem höheren Absorptionsquerschnitt, [49] wobei eine Abhängigkeit von der Partikelgröße besteht. [47, 48, 49]

Daher können 12 nm große Goldnanopartikel mittels Konfokalmikroskopie, welches eine spezielle Form der Lichtmikroskopie darstellt, an der Oberfläche einer Tumorzelle und dadurch auch die Zelle selbst sichtbar gemacht werden. [50] Bei der Dunkelfeldmikroskopie wird ein starker Kontrast durch die Partikelstreuung erreicht, dies ergibt die Möglichkeit des *Multiplexings* durch die Verwendung unterschiedlich großer Nanopartikel [6], somit können mehrere Signale parallel gemessen werden.

Der Molekültransport und die gezielte Pharmakotherapie werden oft gemeinsam eingesetzt. Die Nanopartikel werden hier zum einen mit Medikamenten oder zum anderen mit medizinisch-biologisch relevanten Molekülen ausgestattet, um mit Hilfe von Erkennungseinheiten auf dem Nanopartikel den gewünschten Ort, beispielsweise eine Tumorzelle, zu erreichen und dort wirksam zu werden. Es gibt verschiedene

Möglichkeiten, die wirksamen Moleküle für den Medikamententransport auf dem Nanopartikel zu binden. Sie können unmittelbar oder mittels Verbindungsmolekül auf dem Nanopartikel kovalent oder durch physikalische Wechselwirkungen auf der Ligandenhülle gebunden werden. [6] Mit diesen Methoden der Ligandenbindung an die Nanopartikel können hydrophobe Medikamente durch Wechselwirkung der Partikel mit der Zellmembran in Zellen eingebracht werden, ohne dass zwangsweise eine Aufnahme der Partikel erforderlich ist. [51] Weiterhin kann durch die kovalente Bindung eines Toxins gegen Brustkrebs aufgrund der hohen lokalen Konzentration eine mehr als 10.000-fache Verstärkung der toxischen Wirkung erzielt werden. [52, 53] Auch der Einsatz von photosensitiven Verbindungen zwischen Medikament und Nanopartikel-Ligand zur Freisetzung des wirksamen Stoffes ist erfolgreich gezeigt worden. [23]

Eine spezielle Form des Molekültransports stellt die Transfektion dar. Hierbei wird genetisches Material wie Plasmid-DNA oder siRNA in die Zelle eingebracht, um dort in den Prozess der Transkription einzugreifen. [54] In diesem Zusammenhang wurde gezeigt, dass Goldnanopartikel zum einen die Transfektionseffizienz standardmäßig verwendeter Transfektionsmittel verbessern können. [34, 35] Dies wurde an Epithelzellen des Hundes untersucht und hat zudem ergeben, dass bei der Verwendung von 60 nm Partikeln neben einer Steigerung der Effizienz um etwa 50% [34] keine eindeutig abweichenden zytotoxischen Effekte aufgetreten sind. [35] Hierbei ist anzumerken, dass die Transfektion im Standardverfahren mit Transfektionsmitteln wie Fugene oder Lipofectamin einen breiten Bereich der Toxizität von 0 bis 90% abdeckt. Dies steht in Relation zu der Transfektionseffizienz, welche dem umgekehrt proportional gegenübersteht. [35, 54] Zum anderen konnte ebenfalls gezeigt werden, dass der Einsatz von Goldnanopartikeln ohne weitere Standardtransfektionsreagenzien zur effizienten Transfektion von siRNA [55] und Plasmid-DNA [56] in verschiedene Krebszellen führt. Hierbei konnte beispielsweise eine Verringerung der GFP-Expression von fast 50% durch die AuNP-siRNA-Komplexe erreicht werden. [55]

Der gezielte Transport der Nanopartikel kann aktiv oder passiv erfolgen, wobei letzteres ineffektiver ist. Aufgrund der Anbindung von Erkennungseinheiten an Nanopartikel erhöht sich die lokale Konzentration dieser Moleküle und somit die Spezifität der Partikel sowie ihre Bindungseffizienz an den entsprechenden Zieleinheiten. Es ist gezeigt worden, dass der Einsatz von Erkennungseinheiten eine selektive Verteilung der Nanopartikel entsprechend ihrer Zieleinheit zur Folge hat. [24]

Auch die selektive Aufnahme der Partikel *in-vivo* ist erfolgreich. [25] Es ist anzumerken, dass es hierbei verschiedene Ergebnisse gibt, welche auf eine weniger effiziente Selektivität deuten. [6]

Eine Anwendung als Folge des gezielten Transportes von Goldnanopartikeln, in beispielsweise Tumorzellen, ist die Photothermische Therapie (PTT). Hierbei werden in einer Tumorzelle akkumulierte Goldnanopartikel mit einem Laser bestrahlt, um somit eine Erhitzung der Partikel nach Absorption elektromagnetischer Energie auszulösen. [57, 58] Dies hat eine Zerstörung des Gewebes, welches sich in der unmittelbaren Umgebung der Goldnanopartikel befindet, zur Folge und geschieht durch die Verwendung der Nanopartikel selektiv. [26] Mit dieser Methode sind in einem *In-vivo*-Experiment Tumorzellen in Mäusen selektiv bestrahlt und erfolgreich zerstört worden. [59] Die PTT kann außerdem genutzt werden, um Medikamente innerhalb des biologischen Systems frei zu setzen, da sich durch das Erhitzen die Ligandenhülle der Nanopartikel ablöst. Ferner kann die Verteilung der Nanopartikel nach der Behandlung erreicht werden, weil durch die Bestrahlung der Agglomerate eine Verteilung der Einzelpartikel erreicht wird. [26]

Neben zwei weiteren klinischen Studien mit Goldnanopartikeln, welche die Diagnose von Magenerkrankungen [2] und die photothermische Stammzell-Therapie [3] thematisieren, wurde eine Studie zur photothermischen Behandlung von Arteriosklerose, einer Verkalkung der Arterien, mit Hilfe von Silica-Goldnanopartikeln durchgeführt. Diese Studie ist im Juni 2012 nach der zweiten klinischen Phase beendet worden. [4]

3.2. Plasmonische Goldnanopartikel

Nanomaterialien werden laut Empfehlung einer Kommission der Europäischen Union in einen Größenbereich zwischen 1 nm und 100 nm eingeordnet, wobei mindestens ein Außenmaß dieser Größe entsprechen muss. Außerdem sollen „mindestens 50% der Partikel in der Anzahlgrößenverteilung“ dieser Größe entsprechen. [60]

Diese Beschreibung von Nanomaterialien beinhaltet mehrere mögliche Varianten, so gibt es verschiedene Geometrien wie Sphären, Stäbchen, Platten und auch Kern-Schale-Variationen. [6, 26] Weiterhin kann das Material stark variieren, so gibt es neben Metallpartikeln auch Polymerpartikel oder Partikel aus Halbleitermaterialien. [61] Aufgrund der Auswahl an Nanopartikelvarianten und der in dieser Arbeit eingeschränkten Verwendung von Goldnanopartikeln, werden diese im Folgenden bevorzugt thematisiert.

Kolloide unterscheiden sich in ihren optischen Eigenschaften von ihren Pendanten aus Vollmaterial. Die Grundlage hierzu stellt die Mie-Theorie dar, welche die einstrahlende Wirkung einer ebenen elektromagnetischen Lichtwelle auf eine kolloidale Lösung basierend auf der Maxwell-Gleichung beschreibt. Mit der Theorie wird die Extinktion, bestehend aus Streuung und Absorption, von sphärischen Partikeln beschrieben. Bei dieser Theorie wird angenommen, dass die Partikel kleiner als die Wellenlänge des einstrahlenden Lichtes ($2R < \lambda$) sind, was als Rayleigh-Streuung bezeichnet wird. [26, 62, 63] Wenn die Wellenlänge des Lichts hingegen in der gleichen Größenordnung liegt wie die der Partikel, auf dem sie auftrifft, wird von Mie-Streuung gesprochen. [64] Gustav Mie hat unter anderem festgestellt, dass die Streuung eines Partikels mit zunehmendem Radius r ansteigt, was mit der Proportionalität des Streu-Querschnitts zu r^6 zu erklären ist. Die Absorption hingegen steigt aufgrund der Proportionalität zum Volumen nur geringfügig an. [26]

G. Mie hat diese Entdeckung 1908 gemacht als er die Herkunft der roten Farbe von Goldkolloiden ergründen wollte. [63] Heute ist bekannt, dass Gold [63], ebenso wie auch Silber [63], Titan und Kupfer [63], die Eigenschaft der lokalisierten Oberflächenplasmonenresonanz (LSPR; engl.: localized surface plasmon resonance) besitzt. Das Phänomen der Oberflächenplasmonenresonanz ist verantwortlich dafür, dass Gold in seiner nanopartikulären Form nicht mehr goldfarben, sondern rot erscheint. [6] Hierbei wird davon ausgegangen, dass durch eine einstrahlende Lichtwelle eine Polarisierung der Ladungen in den Partikeln induziert wird. Die

positiven Ladungen werden als unbeweglich angesehen, während die negativen Ladungen des Leitungsbandes beginnen zu schwingen und schließlich alle freien Elektronen gemeinsam oszillieren. [26, 63] (Abbildung 1) Hierbei ist anzumerken, dass die Plasmonenresonanz nur an der Oberfläche bis zu einer Eindringtiefe von maximal 50 nm auftritt. [26]

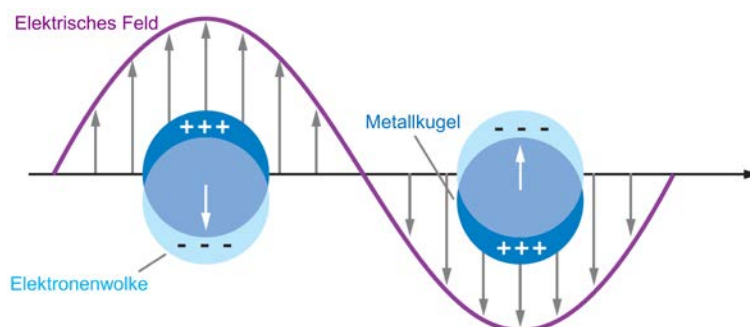


Abbildung 1: Schematische Darstellung der lokalisierten Oberflächenplasmonenresonanz. Adaptiert nach [65].³

Die Oberflächenplasmonenresonanz ist abhängig von verschiedenen Faktoren, wie der Partikelgeometrie, der Partikelgröße, dem Lösungsmittel und der Oberflächenfunktionalisierung. [6] Dies führt dazu, dass beispielsweise Goldnanopartikel mit einer Größe von 90 nm violett erscheinen und nicht mehr rot sind wie es bei einer Größe von 30 nm vorkommt. Eine Folge davon ist, zu erkennen bei der Betrachtung eines Extinktionsspektrums, die Verschiebung des SPR-Peaks in den roten Bereich. [66] (Abbildung 2) Auch eine Verbreiterung des Peaks und eine Erhöhung der Extinktion im nahen Infrarot-Bereich (IR) des Spektrums, was auf eine stärkere Streuung der Partikel deutet, sind Folgen der Vergrößerung von Nanopartikeln oder der Bildung von Agglomeraten oder Aggregaten. [66]

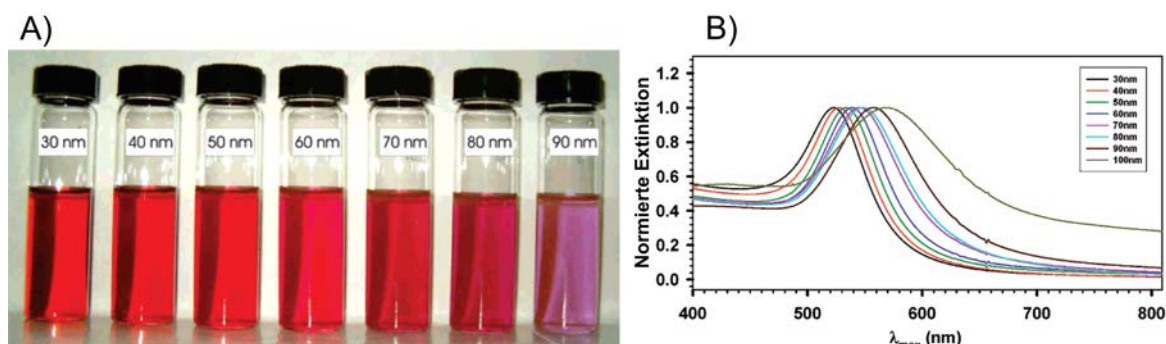


Abbildung 2: Darstellung der größenabhängigen Oberflächenplasmonenresonanz von Goldnanopartikeln. Adaptiert nach [66].⁴

³ Adapted from Katherine A. Willets and Richard P. Van Duyne. Localized Surface Plasmon Resonance Spectroscopy and Sensing. *Annu. Rev. Phys. Chem.*, 58:267 – 297, 2007. Copyright (2007) by Annual Reviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.physchem.58.032806.104607>.

⁴ Adapted with permission from Peter N. Njoki, I-M S. Lim, Derrick Mott, Hye-Young Park, Bilal Khan, Suprav Mishra, Ravishanker Sujakumar, Jin Luo and Chuan-Jian Zhong. Size Correlation of Optical and Spectroscopic Properties for Gold Nanoparticles. *J. Phys. Chem. C*, Vol. 111, No. 40, 14664 – 14669, 2007. Copyright (2007) American Chemical Society. <http://dx.doi.org/10.1021/jp074902z>.

Bei der Bildung von Agglomeraten oder Aggregaten tritt auch der Effekt der Plasmonenkopplung auf. Hierbei ist der Interpartikelabstand zwischen plasmonischen Nanopartikeln so weit reduziert, dass die resonanten Plasmonen zweier Partikel den geringen Abstand überwinden können, gegenseitig koppeln und somit zu einer gemeinsamen resultierenden Plasmonenresonanz beitragen. [67] Daraus resultiert die Rotverschiebung des Plasmonenpeaks.

Nanopartikel mit einer nicht-sphärischen Form unterscheiden sich auch in ihrem Extinktionsspektrum. Bei Nanostäbchen, bei denen die Strukturen in einer Dimension länger sind, tritt neben dem transversalen SPR-Peak, welcher verbreitert und in den roten Bereich verschoben vorliegt, ein zweiter Peak entsprechend der longitudinalen Form im NIR-Bereich auf. [68]

Die Verwendung verschiedener Lösungsmittel, wie auch die Anwesenheit von Liganden an Goldnanopartikeln führt zu einer Veränderung des Brechungsindex der direkten Umgebung der Nanopartikel-Oberfläche und somit der lokalen dielektrischen, also nichtleitenden, Umgebung. Im Allgemeinen kann davon ausgegangen werden, dass bei der Verwendung von Lösungsmitteln ohne funktionale Moleküle wie Cyclohexan, Toluol oder Chloroform die Rot-Verschiebung linear mit ansteigendem Brechungsindex auftritt. [69] Mit funktionalen Molekülen gibt es keine lineare Abhängigkeit. [69] Bezogen auf die Funktionalisierung der Partikel mit Liganden ist eine Verschiebung des SPR-Peaks mit ansteigender Kettenlänge, also mit wachsender Ligandenhülle, zu erwarten. [69, 70, 71]

Neben dem SPR-Peak kann aus dem Extinktionsspektrum von Goldnanopartikeln auch der Primärpartikelindex PPI ermittelt werden. Dieser gibt Aufschluss über den Agglomerationsgrad des vermessenen Kolloids, wobei ein geringer PPI ein agglomeratfreies Kolloid mit kleinen, monodispersen Partikeln, beschreibt und ein hoher PPI auf ein multimodales oder polydisperses Kolloid bzw. einen erhöhten Anteil an Agglomeraten und großen Partikeln hinweist. Die Berechnung erfolgt über das Verhältnis der Goldkonzentration (Ext @ 380 nm) zu dem Anteil an Agglomeraten oder großen Partikeln (Ext @ 800 nm) in der Probe.

$$\text{PPI} = \frac{\text{Extinktion @ 380 nm}}{\text{Extinktion @ 800 nm}} \quad [72, 73] \quad \text{Formel 1}$$

Die Herstellung von Goldnanopartikeln erfolgt hauptsächlich mittels chemischer Synthese nach Turkevich oder Brust. Häufig werden auch Variationen dieser Prozesse durchgeführt, um verschiedene Geometrien zu erreichen oder Stabilisierungsliganden zu variieren. [26, 74] Ein Vorteil dieser Herstellungsverfahren ist die Größenkontrolle und hohe Ausbeute der Nanopartikel. [75, 76] Sie basieren jedoch auch auf der Verwendung von chemischen Stabilisatoren, um eine Aggregation oder das Ausfallen der Nanopartikel zu vermeiden. Diese Stabilisatoren sind oftmals toxisch und verbleiben auch nach der Synthese auf der Oberfläche, was besonders für die Anwendung in biologischen Experimenten nachteilig sein kann. [27] Die Aufreinigung dieser Nanopartikel erfordert einen hohen Aufwand und ist nur selten effektiv. [77] Eine Alternative zur chemischen Synthese ist die gepulste Laserablation in Flüssigkeiten (PLAL; engl.: *pulsed laser ablation in liquids*). [28, 61, 98] Bei diesem Verfahren werden Nanopartikel nur mit Hilfe eines Laserstrahls, einer Flüssigkeit und einem Plättchen des gewünschten Materials hergestellt. [61] Der Kombination aus Ablationsflüssigkeit und Nanopartikelmaterial sind nahezu keine Grenzen gesetzt, somit können sowohl organische Lösungsmittel [61] als auch wässrige Lösungen mit Zusätzen von anorganischen Salzen [61] oder Polymeren [30] verwendet werden, um die Nanopartikel *in situ* zu generieren. Die Ausgangsmaterialien der Partikel variieren von Metallen und Legierungen über Halbleitermaterialien sowie Keramiken. [61] Sie sind in den meisten Fällen leicht erhältlich und vielfach günstiger als die Ausgangsstoffe für eine chemische Synthese. [61]

Bei der Laserablation in Flüssigkeiten trifft der Laserstrahl, für dessen Wellenlänge das verwendete Ablationsmedium idealerweise transparent sein sollte, auf das Abtragsmaterial. Dieses liegt meistens als Plättchen vor und wird *Target* (engl.: Ziel) genannt. Der Laserpuls wird zunächst von dem Material absorbiert, gefolgt von dem Herauslösen des ablatierten Materials aus der Targetoberfläche. (Abbildung 3) Das Herauslösen des Materials wird nach 10^{-12} Sekunden durch ein Raumladungstrennungsfeld und Elektron-Ion-Kollisionen induziert. Durch Erhitzen des Gitters wird kinetische Energie von den angeregten Elektronen übertragen und aufgrund des hohen Temperaturunterschieds zu der umgebenden Flüssigkeit wird Material aus dem Target gelöst. [78] Dieser thermische Prozess ist unter anderem abhängig von den verwendeten Laserparametern und kann in Verdampfung, normales Kochen und explosives Kochen unterteilt werden. Während bei Nanosekundenpulsen das explosive Kochen auftritt, erfolgt die Materiallösung aus dem Target bei dem

Einsatz von Pikosekunden wesentlich schneller und wird somit als Fragmentierung bezeichnet. [78, 79] Das abgetragene Material befindet sich dann in der entstehenden Plasmawolke, welche sich in das umgebende Medium ausbreitet. Nach 10^{-7} Sekunden gibt die Plasmawolke ihre Energie an das umgebende Medium ab und induziert dadurch die Bildung einer Kavitationsblase (10^{-6} s), die sich mit einer Geschwindigkeit von mehr als 10^3 m/s ausbreitet und eine Höhe im Bereich von wenigen Millimetern erreicht. [78] Während dieser Prozess erfolgt, sinkt die Temperatur der Kavitationsblase und der Druck innerhalb der Blase ist niedriger als der außerhalb in dem umgebenden Medium. Nach 10^{-4} Sekunden ist die Kavitationsblase wieder kollabiert und entlässt das ablatierte Material in das Ablationsmedium. [78]

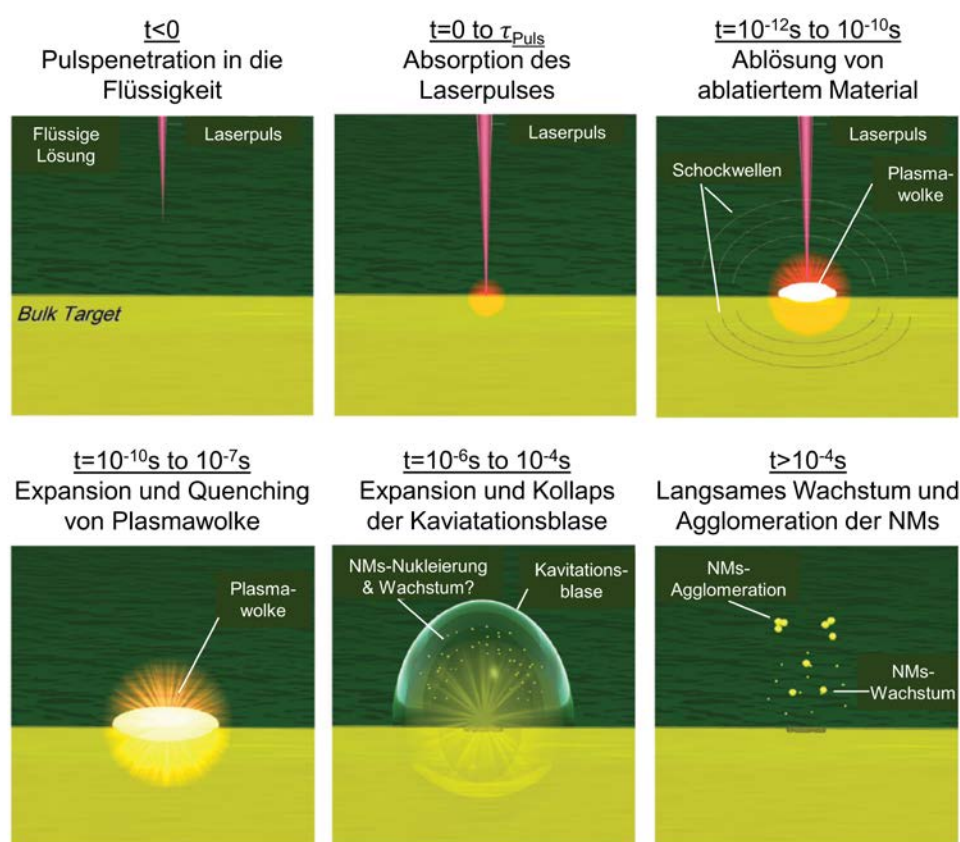


Abbildung 3: Darstellung der zeitlichen Abfolge der Prozesse bei der gepulsten Laserablation in Flüssigkeiten. Adaptiert nach [78].⁵

Der Bildungsmechanismus der Nanopartikel innerhalb der Kavitationsblase ist noch ungeklärt, jedoch konnten innerhalb der hemisphärischen Kavitationsblase zwei Spezies identifiziert werden. Zum einen wurden Primärpartikel gefunden, welche die Blase teilweise durchdringen können und vor dem Kollaps in das Ablationsmedium

⁵ Adapted from Vincenzo Amendola and Moreno Meneghetti. What controls the composition and the structure of nanomaterials generated by laser ablation in liquid solution? *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 15, 3027 – 3046, 2013 with permission of the PCCP Owner Societies. <http://dx.doi.org/10.1039/C2CP42895D>.

gelangen können. Zum anderen befinden sich größere Sekundärpartikel oder Agglomerate in der Kavitationsblase, welche auch nahe der Targetoberfläche zu finden sind. [80, 81]

Mit PLAL produzierte Goldnanopartikel in Wasser oder wässrigen Medien besitzen eine zu 3% - 6% oxidierte Oberfläche, was die Existenz an Au^+ - und Au^{3+} -Spezies auf der Oberfläche zeigt. [82, 83, 84, 85] Dies steht in Verbindung mit der Anwesenheit von sowohl Hydroxygruppen, Au-OH , als auch ihrer deprotonierten Form, Au-O^- , auf der Goldnanopartikeloberfläche. Diese stehen in einem pH-Wert-abhängigen Gleichgewicht, daher liegen bei basischem pH-Wert vermehrt Au-O^- vor, während im sauren Milieu eher Au-OH -Gruppen zu finden sind. [82, 83, 84] Diese oxidierte Oberfläche der Nanopartikel, welche bereits unmittelbar nach dem Herstellungsprozess zu finden ist, führt zu einer reaktiven Spezies mit Elektronenakzeptor-Eigenschaften. In Zusammenhang mit ihrer nackten, ligandenfreien Oberfläche kann dies eine effiziente Oberflächenfunktionalisierung begünstigen [15], jedoch wurde dies mechanistisch noch nicht definitiv bestätigt. Hierbei kann bei einer Funktionalisierung mit anwendungsspezifischen Liganden wie beispielsweise Oligonukleotiden eine fünfmal größere Oberflächenbeladung erreicht werden als bei chemisch hergestellten Nanopartikeln, bei denen zunächst ein Ligandenaustausch stattfinden muss. [15] Eine höhere Beladung der Nanopartikeloberfläche führt zu einer höheren lokalen Konzentration der Liganden, was die Spezifität der Nanopartikel ebenfalls erhöhen kann. Zudem besteht aufgrund der größeren freien Fläche auf den Nanopartikeln die Möglichkeit, mehrere Ligandenspezies in wirksamer Dosis anzubinden und so die Herstellung von multifunktionalen Spezies zu ermöglichen. [86]

Der Vorteil der mittels Laserablation hergestellten Nanopartikel ist unter anderem eine ligandenfreie Oberfläche. Dies stellt jedoch bezüglich der kolloidalen Stabilität ein Problem dar, weil hierbei nur die elektrostatische Stabilisierung vorliegt. Im Folgenden sollen die Theorien und Möglichkeiten zur Partikelstabilisierung erläutert werden.

Die grundlegende Basis zur Stabilität von Nanopartikeln bietet die DLVO-Theorie. [87, 88, 89] Sie beschreibt die Wechselwirkung zweier Partikel in einem elektrostatisch stabilisierten Kolloid. Hierbei werden lediglich elektrostatische Abstoßungskräfte und van-der-Waals-Anziehungskräfte zwischen geladenen Teilchen betrachtet, andere

Kräfte wie die Gravitationskraft oder Kräfte eines magnetischen Feldes werden vernachlässigt. Weiterhin gilt diese Theorie für ausreichend verdünnte Lösungen. Abbildung 4 stellt den Zusammenhang der beiden Kräfte dar. In einem Abstand von mindestens der Distanz der beiden elektrochemischen Doppelschichten zweier Partikel treten keine nennenswerten Wechselwirkungen zwischen den Teilchen auf. Bei einer Annäherung der Partikel zueinander wird ein Maximum der Gesamtkräfte (grüne Kurve) erreicht, bei dem die Abstoßungskräfte (Born-Abstoßung), welche beispielsweise aufgrund der Überlappung der elektrochemischen Doppelschichten entstehen, dominieren. [90, 91] Dies wird als Abstoßungsgrenze bezeichnet. Wird diese Grenze durch weitere Annäherung der Partikel zueinander überschritten, dominieren die Anziehungskräfte bis schließlich das erste Minimum erreicht wird, an dem eine Agglomeration der Partikel entsteht. [90]

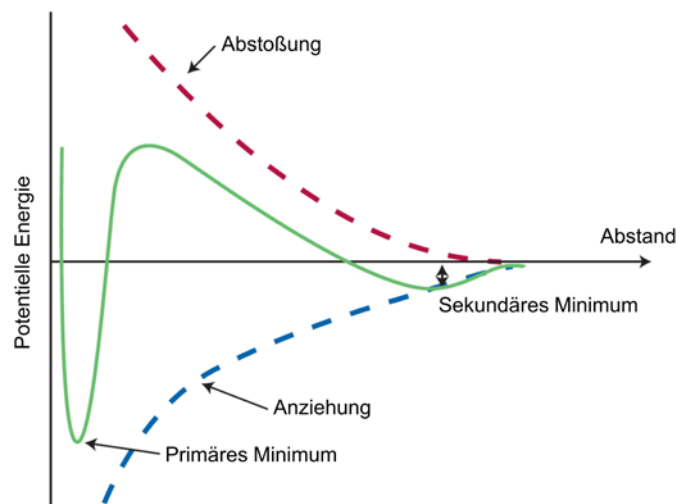


Abbildung 4: Darstellung der Anziehungs- und Abstoßungskräfte als potentielle Energie in Abhängigkeit des Interpartikelabstandes zwischen zwei kolloidalen Partikeln. Adaptiert nach [92].⁶

Das Gesamtpotential der Partikel wird von der Anwesenheit von Gegenionen, insbesondere ihrer Ladung und Konzentration, beeinflusst. Dadurch verschiebt sich die Abstoßungsgrenze zu einem geringeren Abstand der Partikel zueinander. Das sekundäre Minimum tritt nicht in jedem Fall auf, sondern nur, wenn die Konzentration der Gegenionen zu groß wird. Die Partikel agglomerieren und fallen aus, was den Prozess der Flokkulation beschreibt. [90]

In diesem Zusammenhang, wenn Partikel sich in einer wässrigen Lösung befinden, kann der vorherrschende Zustand an der Oberfläche der Partikel von einem Doppelschichtmodell beschrieben werden. Hierbei lagern sich Ionen aus der

⁶ Adapted by permission from Macmillan Publishers Ltd: Nature Materials (Gianpietro Malescio. Intermolecular potentials - past, present, future. Nat. Mater., Vol. 2, 501 – 503, 2003. <http://dx.doi.org/10.1038/nmat949>, copyright (2003).

umgebenden Lösung mit entgegengesetzter Ladung an der Partikeloberfläche an, wobei grundsätzlich drei Modelle unterschieden werden können. Zum einen gibt es das Helmholtz-Modell, bei dem sich die Ladungen in einer Schicht an der Partikeloberfläche anlagern und das Potential nach außen hin linear abnimmt. (Abbildung 5 A) Bei dem Gouy-Chapman-Modell hingegen erfolgt die Anlagerung der Gegenionen in einer diffusen Schicht, wobei die Abnahme des Potentials exponentiell verläuft. (Abbildung 5 B) Das dritte Modell zur Beschreibung des Anlagerungsverhalten der Gegenionen erfolgt durch eine Kombination der ersten beiden und resultiert in dem Gouy-Chapman-Stern-Modell. (Abbildung 5 C) Hierbei lagert sich zunächst eine starre Schicht an Gegenionen, die Sternschicht, an der Partikeloberfläche an und geht über in eine diffuse Schicht. [91, 93]

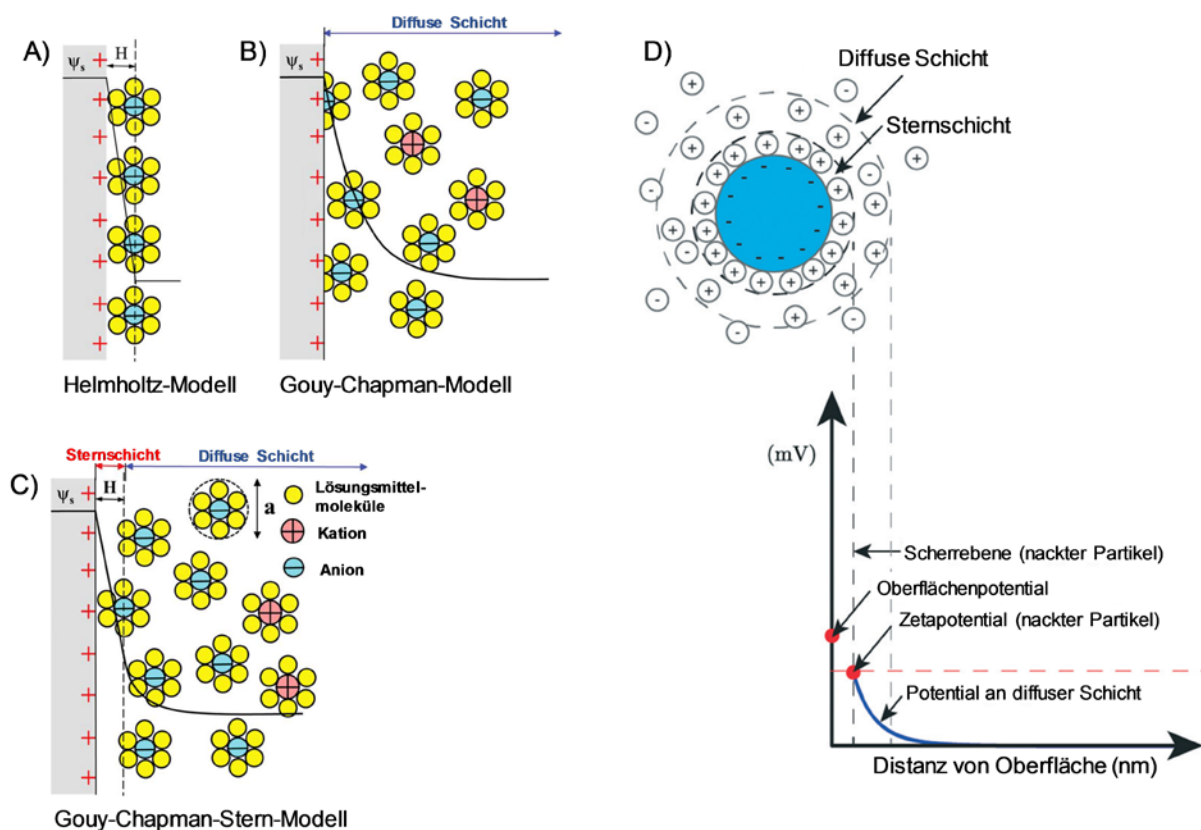


Abbildung 5: Darstellung des Prinzips der elektrochemischen Doppelschicht an der Oberfläche eines Partikels anhand des Helmholtz-Modells (A), des Gouy-Chapman-Modells (B) und des Gouy-Chapman-Stern-Modells (C). H beschreibt die Dicke der Doppelschicht im Helmholtz-Modell und die Dicke der Sternschicht. ψ beschreibt das Potential an der Oberfläche der Elektrode. Adaptiert nach [93].⁷ Darstellung des Zusammenhangs zwischen der diffusen und der Sternschicht und dem Zetapotential. (D) Adaptiert nach [94].⁸

⁷ Laurent Pilon, Hainan Wang and Anna d'Entremont. Recent Advances in Continuum Modeling of Interfacial and Transport Phenomena in Electric Double Layer Capacitors. J. Electrochem. Soc., 162 (5) A5158 – A5178, 2015. This figure is used under CC BY 4.0 / Adapted from original. <http://dx.doi.org/10.1149/2.0211505jes>.

⁸ Adapted from Gregory V. Lowry, Reghan J. Hill, Stacey Harper, Alan F. Rawle, Christine Ogilvie Hendren, Fred Klaessig, Ulf Nobbmann, Philip Sayre and John Rumble. Guidance to improve the scientific value of zeta-potential measurements in nanoEHS. Environ. Sci.: Nano, 3, 953 – 965, 2016 with permission of The Royal Society of Chemistry. <http://dx.doi.org/10.1039/C6EN00136J>.

Die Dicke der diffusen Schicht ist abhängig von der Menge an Gegenionen in der Lösung und somit von der Ionenstärke. Ein Parameter, der hierbei zur Beschreibung des Systems herangezogen werden kann, ist die Debye-Länge κ^{-1} . Bei der Reduktion der Ionenstärke, vergrößert sich auch die Dicke der diffusen Schicht, wodurch die Debye-Länge ebenfalls vergrößert wird. [95] Neben der Ionenstärke steht die Debye-Länge auch in Korrelation mit der Partikelgröße, wodurch schließlich zwei Bereiche identifiziert werden können, der Smoluchowski- und der Hückel-Bereich. [95, 96] Während der Bereich nach Smoluchowski für große Partikel ab 100 nm und Ionenstärken ab etwa 150 mM gilt, können kleine Partikel bei geringen Ionenstärken besser durch die Annahmen von Hückel beschrieben werden. Hierbei können viskose Beanspruchungen, welche aufgrund der Migration von Gegenionen erfolgen können, vernachlässigt werden. Dies liegt an der reduzierten Ladungsdichte. [96] Es gilt folgender Zusammenhang.

1) Smoluchowski-Bereich: $\kappa \cdot r \gg 1$ [95, 96] Formel 2

2) Hückel-Bereich: $\kappa \cdot r \ll 1$ [95, 96] Formel 3

Mit: κ = Debye-Parameter, r = Partikelradius

Die Abdeckung des vollständigen Bereiches der Ionenstärke und der Partikelgröße wird durch die Henry-Funktion (Formel 4) erreicht.

$$1 \leq f_H(\kappa \cdot r) \leq 3/2 \quad [96] \quad \text{Formel 4}$$

Das Potential, welches an der Grenze der starren Schicht zu der diffusen Schicht gemessen werden kann, ist das Zetapotential. (Abbildung 5 D) Das Zetapotential ist von der Oberflächenladung zu unterscheiden, da diese die oberflächenlokalisierte Ladung hinter der Scherebene beschreibt. Bei der Messung des Zetapotentials wird ein elektrisches Feld angelegt, durch das die diffuse Schicht um die Nanopartikel abgeschert wird und so das Potential an der Scherebene gemessen werden kann. Hierbei wird zwischen den oben beschriebenen Bereichen nach Hückel und Smoluchowski unterschieden. [96]

Weiterhin muss zwischen ligandenfreien und oberflächenfunktionalisierten Nanopartikeln unterschieden werden. Bei der Analyse des Zetapotentials von ligandenfreien Nanopartikeln können die bereits beschriebenen Annahmen getroffen werden. Befinden sich jedoch Liganden auf der Oberfläche des Nanopartikels, wird die

Bestimmung des Zetapotentials wesentlich komplexer. Hierbei müssen verschiedene Faktoren wie die Ladung, die Größe und Konformation der Liganden berücksichtigt werden. Weiterhin ist auch der Einfluss des Lösungsmittels zu beachten, da sich die Konformation und Ladung der Liganden dadurch ändern können. Es ist zudem möglich, dass die Liganden mit dem umgebenden Lösungsmittel reagieren. Für die möglichst genaue Bestimmung des Zetapotentials von Nanopartikel-Konjugaten müssen somit weitaus mehr Parameter bekannt sein als bei der Analyse von ligandenfreien Partikeln. Hierunter zählen beispielsweise die Gesamtgröße des Konjugats (Feret-Durchmesser + Ligandengröße), die hydrodynamische Größe, die Dicke der Ligandenschicht sowie die sogenannte Brinkman-Abschirmungslänge. [96]

Eine Stabilisierung von lasergenerierten Goldnanopartikeln kann auch nach anderen Mechanismen stattfinden. So liefert die DLVO-Theorie bei der Verwendung von kosmotropen (F^- , SO_4^{2-}) und chaotropen (Cl^- , Br^- , I^- , NO_3^- , SCN^-) Anionen in dem Abtragsmedium während des Laserabtrags (*in situ*) keine ausreichende Erklärung der Stabilisierung. Unter Verwendung dieser Anionen, welche der Hofmeister-Reihe folgen, erfolgt eine spezifische Adsorption an der Oberfläche der Nanopartikel, welche abhängig von der Hydratisierung und Polarisierbarkeit der Anionen zu einer Stabilisierung führt. [85] Chaotrope Anionen mit einer kleinen Hydrathülle sammeln sich verstärkt direkt an der Partikeloberfläche in der Sternschicht an. Die stärker hydratisierten kosmotropen Anionen hingegen werden von der Oberfläche abgestoßen. Dies führt zu einer stärkeren Stabilisierung der Nanopartikel durch chaotrope Anionen. Chlorid und Nitrat gehören zwar auch den chaotropen Anionen an, adsorbieren aber weniger spezifisch aufgrund ihrer geringeren Polarisierbarkeit und führen somit auch zu einer geringeren Stabilität im Vergleich zu den anderen Anionen. [85, 95]

Der Einsatz von Salzen während der laserbasierten Synthese der Goldnanopartikel wirkt sich nicht nur positiv auf ihre Stabilität aus, sondern hat auch einen Effekt auf die resultierende Größe der Nanopartikel. Durch die Verwendung von mikromolar konzentrierten Lösungen aus Natriumbromid, Natriumchlorid oder Natriumphosphatpuffer tritt ein Größen-Quenching bis zu einer minimalen Größe von etwa 5 nm auf. [72, 73] Dies ist gegensätzlich zu der Bildung von Agglomeraten bei

höheren Salz-Konzentrationen im millimolaren oder molaren Konzentrationsbereich. [97]

Auch bei der Verwendung der ionischen Lösungen während des Laserabtrags wird zwischen höheren und niedrigeren Ionenstärken unterschieden. Die Grenze, welche auch von der Goldkonzentration abhängt, liegt hier etwa bei 50 μM für NaCl [73, 85] und bei 0,1-2 mM für Natriumphosphatpuffer [72]. In dem Bereich höherer mikromolarer Konzentrationen wird davon ausgegangen, dass die bei der Nanopartikelentstehung auftretende Koaleszenz zur Vergrößerung der Partikel durch die Anwesenheit der Anionen in der Lösung gestoppt wird. Die Anionen blockieren die Oberfläche und stabilisieren diese zusätzlich. (Abbildung 6) Beim Einsatz kleinerer Salz-Konzentrationen ist die Menge an Anionen nicht mehr ausreichend, um die größere Gesamtoberfläche der kleinen Nanopartikel ausreichend vor Koaleszenz zu schützen. Die Folge ist ein Wachstum zu größeren Partikeln, ebenso wie eine polydisperse Verteilung der Nanopartikel. Eine Erklärung dieser Effekte wird einerseits über einen Ioneneffekt, bei dem eine spezifische Adsorption der Anionen an der Oberfläche oder ein Austausch dieser mit dem Sauerstoff auf der Oberfläche stattfindet, erklärt. Die Begründung über einen pH-abhängigen Effekt kann im Falle von Natriumphosphatpuffer herangezogen werden, da sich hier der pH-Wert mit steigender Pufferkonzentration bis zu dem zu puffernden pH-Wert erhöht. [73]

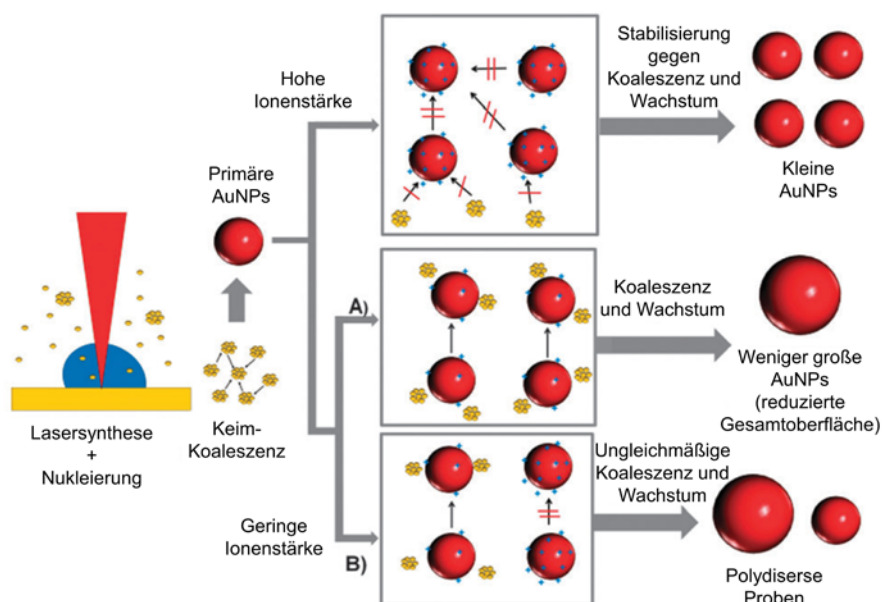


Abbildung 6: Wachstumsmechanismus von Goldnanopartikeln für die Herstellung der Nanopartikel in mikromolar konzentrierten salzhaltigen Ablationsmedien. Adaptiert nach [73].⁹

⁹ Adapted from Christoph Rehbock, Vivian Merk, Lisa Gamrad, René Streubel and Stephan Barcikowski. Size control of laser-fabricated surfactant-free gold nanoparticles with highly diluted electrolytes and their subsequent bioconjugation. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 15, 3057 – 3067, 2013 with permission of the PCCP Owner Societies. <http://dx.doi.org/10.1039/C2CP42641B>.

Ein Größen-Quenching von lasergenerierten Goldnanopartikeln kann nicht nur durch den Einsatz von mikromolaren Elektrolyt-Lösungen erreicht werden. Andere Möglichkeiten sind die gepulste Laserfragmentierung [98] von Nanopartikeln sowie die *In-situ*- und die verzögerte Konjugation. [98] Eine Vergrößerung von Nanopartikeln hingegen kann über das gepulste Laserschmelzen erreicht werden. [98] Im Folgenden soll jedoch lediglich auf das Quenching der Partikelgrößen eingegangen werden. Die laserbasierte Fragmentierung von Nanopartikeln ist ein der Laserablation nachgeschalteter Prozess zur Verkleinerung der Nanopartikel. Hierbei werden die Nanopartikel nach einer resonanten oder nicht resonanten Bestrahlung in kleinere Partikel aufgesprengt. Dies kann aufgrund eines photothermischen Effektes, einer Nahfeldablation oder einer Coulomb-Explosion, bei der eine große Menge an Elektronen aus den Partikeln herausgestoßen werden, erfolgen. [98, 99]

Die Größenkontrolle mit zur Hilfenahme von Liganden sind die *In-situ*-Konjugation und die verzögerte Konjugation. Bei der *In-situ*-Konjugation liegen die Liganden in dem Ablationsmedium vor und binden unmittelbar nach der Entstehung der Nanopartikel an diese Moleküle. Dies hindert die Partikel daran, weiter zu wachsen oder mit anderen Partikeln zu koagulieren. Abhängig von der eingesetzten Ligandenkonzentration kann sowohl die Größe als auch die Verteilungsbreite der Größe drastisch verringert werden. [15, 29, 32] Die Verringerung der Fluenz und der Fokusposition [29], ebenso wie die Erhöhung der Repetitionsdauer [100] haben ebenfalls einen Einfluss auf die Partikelgröße und führen zu kleineren Durchmessern. Ein Nachteil der *In-situ*-Konjugation ist zum einen die ungenaue Einstellung des Ligand-zu-Nanopartikel-Verhältnisses [72] und zum anderen die Einstellung der Nanopartikelgröße sowie der Größenverteilung, welche von der Anwesenheit und der Konzentration der Liganden abhängt. [10, 30] Weiterhin stellt bei der *In-situ*-Konjugation die photoinduzierte Degradation der Liganden ein mögliches Problem dar. Dies kann jedoch durch geringe Pulsenergien, Fokuspositionen und Abtragszeiten umgangen werden. [29]

Eine weitere Möglichkeit, die Degradation der Liganden zu umgehen, ist die verzögerte Konjugation. Hierbei wird ein Durchflussreaktor als Abtragskammer verwendet, so werden die ablatierten Nanopartikel unmittelbar nach der Entstehung abgeführt und können durch Zugabe des Liganden an verschiedenen Positionen des Reaktors in ihrem Wachstum gehemmt werden. [18, 32] Bei diesem Prozess werden umso kleinere Nanopartikel erhalten, je schneller die Liganden zu dem Partikelstrom gegeben werden. [18]

Wie bereits beschrieben (Kapitel 3.1), sind Goldnanopartikel unter anderem aufgrund ihrer besonderen optischen Eigenschaften eine oft verwendete Spezies für *In-vitro*- und *In-vivo*-Experimente. Aufgrund ihrer ligandenfreien Oberfläche bieten sich lasergenerierte Nanopartikel für medizinisch-biologische Untersuchungen an, da in diesem Fall keine Effekte und Wechselwirkungen von ungewünschten Liganden auftreten können. [27, 101] Außerdem können sie durch die freie Wahl an Liganden und Funktionsmolekülen, welche auf der Oberfläche der Nanopartikel gebunden werden können, optimal auf die Anwendungen angepasst werden.

Ein wichtiger Punkt für jegliche Anwendung im medizinisch-biologischen Bereich stellt die Toxizität der Materialien dar, denn auch wenn Gold als Edelmetall inert ist und die Herstellung der Nanopartikel unter reinsten Bedingungen erfolgt, kann die Darreichung als Nanopartikel insbesondere bezogen auf die Menge der Partikel toxisch wirken. Die Dosis [102, 128] ist neben anderen Faktoren wie Größe [102, 103, 104] und Form [102] der Partikel, Ladung [102, 103, 104], Bedeckung [102, 104] und Hydrophobizität [103] der Oberfläche ein wichtiger Parameter. Aufgrund der vielen Einflussfaktoren, ebenso vielen experimentellen Szenarien und bestimmten Parametern gibt es eine Vielfalt an Daten, welche Goldnanopartikel als toxisch oder nicht toxisch einstufen. [104] Hierbei sind große Abweichungen bei dem experimentellen Design zu beobachten, was an dem Einsatz unterschiedlicher Partikelgrößen, Formen, Funktionalisierungsmethoden, Tierarten, Partikeldosen und Methoden der Verabreichung liegt. [105]

Bei chemisch hergestellten Nanopartikeln ist gezeigt worden, dass ein toxischer Effekt aufgrund der Oberflächenbedeckung mit Trinatriumcitrat- oder auch CTAB-Liganden auftritt [27, 101] und teilweise durch Aufreinigung der Partikel verringert wird. [27] Auch die Funktionalisierung mit dem CALNN-Peptid weist bei Goldnanopartikeln zwischen 13 nm und 60 nm einen zytotoxischen Effekt auf. [106]

Bei Oberflächenfunktionalisierungen, welche aus Polymeren oder Proteinen bestehen, ist jedoch keine Toxizität festgestellt worden. So erwiesen sich Ligandenhüllen aus Polyacrylamid [36], PEG [107], PVP [108, 109] oder BSA [110] als nicht toxisch.

Aufgrund dieser unterschiedlichen Erkenntnisse stellen ligandenfreie Nanopartikel mittels Laserablation eine Alternative dar. Jedoch besteht hierbei die Tendenz zur Agglomeration bei Überführung in biologische Puffersysteme, was durchaus einen Einfluss auf die Funktion von Zellen haben kann, wie es bei Bullenspermien gezeigt wurde. Hierbei wurde die Motilität und Fertilisationsfähigkeit der Spermien reduziert,

allerdings erst ab einer Anzahldosierung von 14.000 Nanopartikeln pro Spermium. Da hierbei eine Reaktion der freien Nanopartikel mit Thiol- oder Disulfid-Gruppen auf der Spermienmembran vermutet wird [111], konnte dieser Effekt durch die Funktionalisierung mit biologisch relevanten Molekülen wie Oligonukleotiden oder Proteinen verhindert werden. [8, 111]

Aufgrund dessen, dass lasergenerierte Goldnanopartikel im Bereich der sensitiven Reproduktionsbiologie keine oder leicht zu vermeidende toxische Effekte zeigen, weisen sie eine gute Biokompatibilität auf und ermöglichen die Einsatzfähigkeit in verschiedene weitere Anwendungsgebiete. [7, 8, 9] Hierbei wurden die Untersuchungen unter anderem an BSA- und Citrat-stabilisierten Goldnanopartikeln, welche 6 nm, 8 nm und 20 nm groß waren, untersucht. [8]

Ein Aspekt bei der Toxizität ist die Ladung der Nanopartikel. Hierbei konnte festgestellt werden, dass kationische Partikel eher toxisch sind als anionische. [112, 113]

Die Partikelgröße ist ebenfalls ein wichtiger Punkt bei der Einstufung der Toxizität von Goldnanopartikeln. Allerdings ist es sehr schwierig verschiedene Studien lediglich bezüglich der Größe zu vergleichen, da andere Parameter wie Oberflächenliganden, Konzentrationen und Zelllinien meistens unterschiedlich sind, aber auch Einflüsse auf die Toxizität haben. So werden beispielsweise Nanopartikel zwischen 5 nm und 70 nm [101] sowie zwischen 3 nm und 100 nm [114] als biokompatibel beschrieben. Dennoch sind auch Studien veröffentlicht worden, bei denen 45 nm große Partikel einen toxischeren Effekt aufweisen als 13 nm große Partikel [115] oder Goldnanocluster mit einem Durchmesser von 1,4 nm als toxisch eingestuft werden, während Cluster der Größe 0,8 nm, 1,2 nm und 1,8 nm nicht toxisch sind. [116] Darüber hinaus beschreibt eine Vielzahl an Arbeiten die Biokompatibilität von Goldnanopartikeln verschiedenster Größen von 3 nm [117], 3,5 nm [118], 4 nm [119], 5 nm [120], 13 nm [119], 10 nm [121], 15 nm [107, 110], 18 nm [122, 123], 20 nm [124], 30 nm [125], 40 nm [126], 50 nm [121].

Zusammen mit der Konzentration, welche bereits bei bis zu 0,8 mg/L zu einer Störung der Motilität und Proliferation führt [127] und bei anderen Studien bei 10 mg/L noch kein signifikanter Einfluss zu finden ist [111], wurde eine von der Zellanzahl unabhängige Empfehlung zur Verwendung von Nanopartikeln zwischen 3 nm und 100 nm sowie 10^{12} Partikel pro 1 mL ausgesprochen. [105]

Bezüglich der Partikeldosierung treten bei den durchgeführten Analysen insbesondere bei der Angabe der Dosis Abweichungen auf. Hierbei ist die Angabe als Massenkonzentration weit verbreitet. Problematisch ist hierbei jedoch, dass Nanopartikel andere Effekte aufweisen als lösliche Substanzen, hierzu zählen unter anderem Oberflächenadsorption oder Katalyse. Auch der Aspekt, dass viele Effekte in biologischen Experimenten nach Nanopartikelbehandlung oberflächenabhängig sind, wird somit ignoriert. Ein sehr wichtiger Punkt ist hierbei der Vergleich verschiedener Größen bei gleicher Massenkonzentration, denn hierbei wird der Einfluss vieler kleiner Partikel mit dem Einfluss weniger großer Partikel verglichen. Eine Empfehlung hierzu ist die oberflächenabhängige oder zellbezogene Angabe der Dosis in cm^2 der Nanopartikeloberfläche pro Zelle. Dies würde zu einer besseren Vergleichbarkeit der Toxizitätsdaten führen. [128]

Schließlich ist anzumerken, dass selbst nach der Standardisierung der Dosisangabe und wenn alle anderen Parameter der Zelltests einheitlich sind, die Toxizität der Partikel von dem getesteten Zelltyp abhängt. [105]

3.3. Biologische Funktionsmoleküle

Es gibt eine Vielzahl an medizinisch-biologisch relevanten Funktionsmolekülen. In diesem Kapitel soll aufgrund der Relevanz lediglich auf zwei Typen eingegangen werden, die Oligonukleotide und die Peptide.

Oligonukleotide bestehen aus mehreren aneinander gereihten Nukleotiden, welche wieder aus drei Bestandteilen bestehen, einer Base, einer Pentose [129] und mindestens einer Phosphatgruppe. Im Fall der DNA (Desoxyribonukleinsäure, engl.: desoxyribonucleic acid) handelt es sich bei der Pentose um die Desoxyribose, an welche eine Phosphatgruppe und eine Base gebunden ist. Es gibt vier Basen, die bei einer DNA vorkommen können, Adenin (A), Guanin (G), Thymin (T) und Cytosin (C).

Die Einzelstränge einer DNA werden über eine Bindung zwischen den Phosphat- und Pentosemolekülen aufgebaut und bestehen immer entweder aus einer Abfolge von Adenin und Guanin oder Thymin und Cytosin. (Abbildung 7 A) Diese Sequenzen können sich durch das Ausbilden von Wasserstoffbrückenbindungen zu einem Doppelstrang vereinigen, wobei immer Adenin mit Thymin und Guanin mit Cytosin ein Basenpaar bildet. Dies ist auch bekannt als die Watson-Crick-Basenpaarung [130] (Abbildung 8 B und C), welche nach ihren Entdeckern benannt ist.

Bei der Ausbildung eines Doppelstrangs liegen die Einzelstränge antiparallel zueinander vor, so dass die 5'-Phosphatgruppe des einen Strangs mit der 3'-Hydroxygruppe des anderen Strangs wechselwirkt. Weiterhin liegen die Basenpaare innerhalb des Doppelstrangs, welcher eine rechts gedrehte Struktur aufweist. [131] DNA-Einzelstränge können mit einer Thiolgruppe funktionalisiert werden [16], ohne dass ihre Funktionsfähigkeit zur Ausbildung eines Doppelstrangs eingeschränkt wird. [20] Hieraus resultiert die Möglichkeit einer Anbindung an Goldnanopartikel, um sie beispielsweise für sensorische Anwendungen einzusetzen. [20, 97]

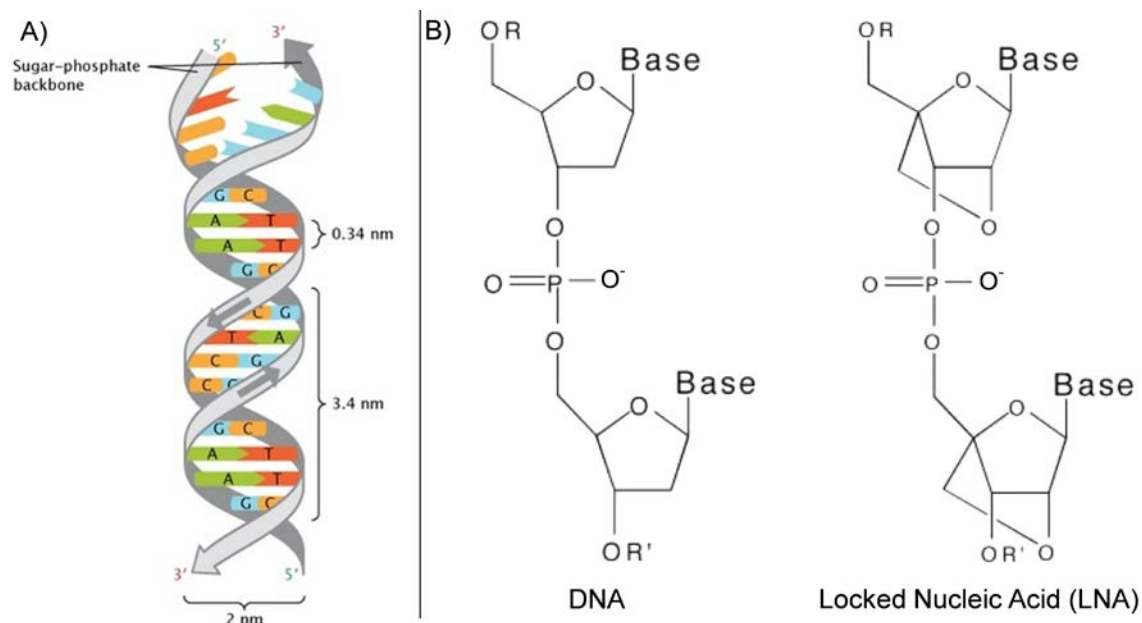


Abbildung 7: A) Darstellung der dreidimensionalen Doppelhelix-Struktur von DNA. Adaptiert nach [131]¹⁰; B) Strukturelle Darstellung der Nukleotide von DNA und LNA. Adaptiert nach [132].¹¹

Eine modifizierte Variante eines DNA-Strangs ist die *Locked Nucleic Acid* (LNA), bei der eine strukturelle Veränderung der Ribose in Form einer Brücke zwischen dem 2'-Sauerstoffatom und dem 4'-Kohlenstoffatom vorzufinden ist. (Abbildung 7 B)

Durch diese Brücke in der Ribose wird die Flexibilität, welche die ursprüngliche DNA besitzt, verringert. Die LNA bietet einige Vorteile, so ist sie nicht toxisch [132, 133], löslich in Wasser und außerdem stabil. [134] Zudem weist sie wie die DNA eine negative Ladung auf, welche auf die Deprotonierung des Phosphatbausteins jedes Nukleotids zurückzuführen ist. Neben der Hybridisierung, also der Ausbildung eines Doppelstrangs mit DNA-Einzelsträngen in Verbindung mit der erhöhten Stabilität des Doppelstrangs [135, 136], kann die LNA mit einem bereits bestehenden DNA-Doppelstrang bei neutralem pH-Wert zu einem Triplex hybridisieren. [132] Die Hybridisierung der LNA zu einem Triplex erfolgt durch Hoogsteen-Wasserstoff-Bindungen in der großen Furche (engl.: major groove) der DNA. [137] (Abbildung 8) Schließlich reagiert die LNA bei der Hybridisierung sensitiv auf das Auftreten von Fehlanpassungen (engl.: mismatches), dies erhöht die Spezifität dieser Substanz. [133, 136, 138] Sowohl die Affinität als auch die Spezifität der LNA bezüglich der Hybridisierung ist optimal bei kurzen Sequenzen, welche weniger als 10 Basen enthalten. [132, 135]

¹⁰ Leslie A. Pray. *Discovery of DNA Structure and Function: Watson and Crick*. Nat. Educ., 1(1):100: 1 – 7, 2008. Copyright 2013 Nature Education. (<http://www.nature.com/scitable/topicpage/discovery-of-dna-structure-and-function-watson-397>)

¹¹ Reprinted from the *Chemistry & Biology*, Vol. 8, Dwaine A Braasch and David R Corey, *Locked nucleic acid (LNA): fine-tuning the recognition of DNA and RNA*, pages 1 – 7, Copyright (2001) with permission from Elsevier. www.sciencedirect.com/science/article/pii/S107455210000582.

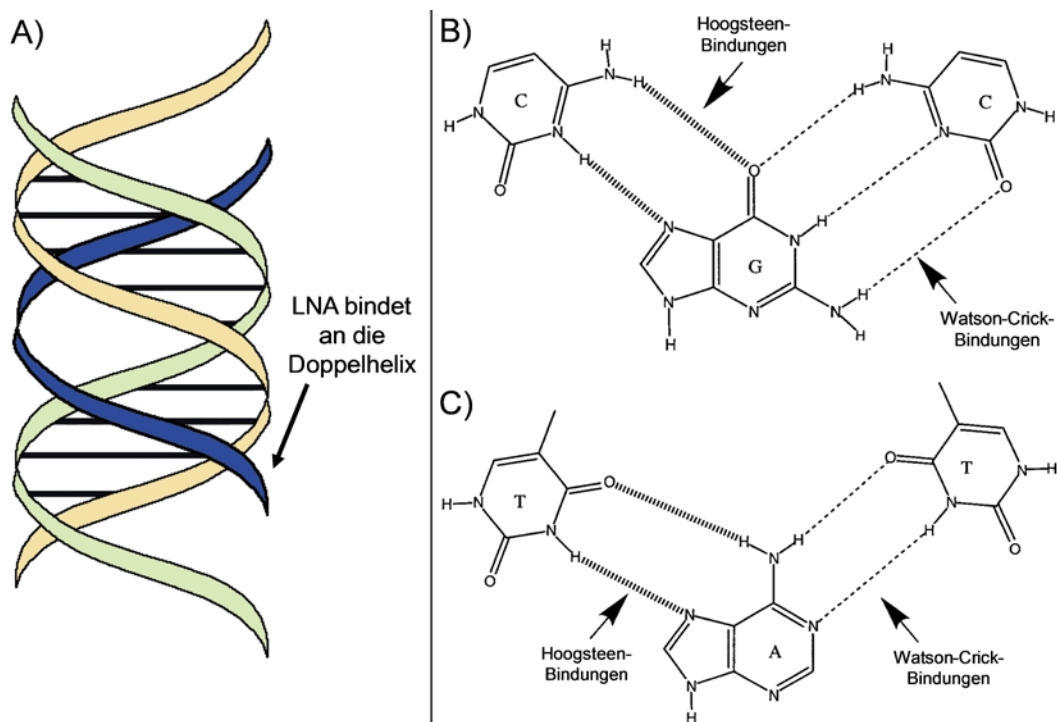


Abbildung 8: Darstellung eines Triplex: A) Darstellung einer Doppelhelix, an die eine LNA hybridisiert und einen Triplex formt. Adaptiert nach [137].¹² B und C) Darstellung der Bindungen zwischen den Basenpaaren in einem Triplex für die Basenpaarung C:G:C und T:A:T. Adaptiert nach [139].¹³

Bei der Beschreibung der Peptide soll vor allem auf die Gruppe der zellpenetrierenden Peptide (CPP, engl.: cell penetrating peptides) eingegangen werden. Diese Peptide besitzen die Fähigkeit, die Membran von biologischen Zellen zu durchdringen ohne sie dabei zu zerstören. [140] Weiterhin können zellpenetrierende Peptide auf dem Weg durch die Zellmembran andere Moleküle wie Polymere [141], Nukleinsäuren [142], aber auch Nanopartikel [143] transportieren und somit diese Spezies in die Zelle bringen.

Peptide im Allgemeinen sind kurze Sequenzen von Aminosäuren. In der Gruppe der CPPs sind die Moleküle aus weniger als 30 Aminosäuren aufgebaut und meistens bei physiologischem pH-Wert positiv geladen, da 17-100% der in den Sequenzen enthaltenen Aminosäuren eine positive Ladung tragen. [144] Eine Ausnahme bildet das negativ geladene SAP (engl.: Sweet Arrow Peptide), welches zum größten Teil aus Prolin aufgebaut ist. [145] Weiterhin besitzen diese Peptide einen hydrophoben und, ausgenommen der Polyarginine, einen amphiphilen Charakter. [144]

¹² Republished with permission of The American Society for Clinical Investigation, from *The potential for gene repair via triple helix formation*, Michael M. Seidman and Peter M. Glazer, 112:487 – 494, 2003; permission conveyed through Copyright Clearance Center, Inc. (<http://www.jci.org/articles/view/19552>)

¹³ Melissa P. Knauer and Peter M. Glazer. *Triplex forming oligonucleotides: sequence-specific tools for gene targeting*. *Hum. Mol. Genet.*, 2001, Vol. 10, No. 20, 2243 – 2251, by permission of Oxford University Press. (<https://doi.org/10.1093/hmg/10.20.2243>).

Nachdem 1988 das erste zellpenetrierende Peptid, das TAT-Peptid [146], entdeckt wurde, folgten etwa 100 verschiedene Sequenzen, die heute zu dieser Gruppe gehören. [144] Es gibt keine einheitliche Einteilung dieser Sequenzen, so können sie beispielsweise bezüglich ihrer Sequenz und ihres Ursprungs unterschieden werden. [147] Eine Abgrenzung stellen gering amphiphile Sequenzen, wie Penetratin, TATp oder Polyarginine dar, während MAP, Transportan und Pep-1 die Gruppe der stärker amphiphatischen Peptide bildet. In einer dritten Gruppe sind Ladung und Hydrophobizität der Aminosäuren auf der Sequenz getrennt. Hierzu gehören das vaskuläre Endothel-Cadherin-Peptid (pVEC) und das MPG-Peptid. Untergruppen können weiterhin beispielsweise in prolinreiche oder polyprolin-amphiphatische Sequenzen, antimikrobielle Peptide und zweigliedrige Peptide erfolgen. [147] Dadurch, dass Peptide synthetisierbar sind und die Aminosäure Cystein eine Thiol-Gruppe besitzt, können zellpenetrierende Peptide einfach hergestellt werden. Diese können kovalent an Goldnanopartikel gebunden werden.

Der Internalisierungsmechanismus der Peptide hängt von verschiedenen Faktoren wie der Peptid-Konzentration, der Art des Peptids, dem zu transportieren Molekül oder Nanopartikel und auch von der zu penetrierenden Zelle ab. [147, 148] Aufgrund der Tatsache, dass es eine Vielzahl an Variationsmöglichkeiten gibt, besteht auch bezüglich der Internalisierung kein einheitlicher Prozess. Die beiden grundlegenden Möglichkeiten sind jedoch die Endozytose und die direkte Translokation. [140]

Die Endozytose wird unterteilt in die Phagozytose, welche lediglich bei speziellen Zellen wie Makrophagen auftritt, und die Pinozytose, welche für die Aufnahme in den meisten Zellen zu verantwortlich. [140] Die Pinozytose kann weiter aufgeteilt werden in verschiedene Mechanismen, hierunter fallen die Makropinozytose [140, 147], die Clathrin-vermittelte Endozytose [140, 147], die Caveolae/lipid-raft-vermittelte [147] und die Clathrin/Caveolae-unabhängige [147] Endozytose. Von diesen Aufnahmewegen stellt die energieabhängige Makropinozytose den primären Weg dar und führt zur Aufnahme von großen Molekülen und Nanopartikeln. [147] Die Beschreibung der Aufnahmemechanismen der CPPs weichen zum Teil voneinander ab. Dies kann durch verschiedene Faktoren wie Unspezifität, Toxizität und die Verwendung verschiedener Zelllinien, Peptidkonzentrationen sowie Inkubationszeiten hervorgerufen werden. [140] Auch die Substanzen, welche an die CPPs gekoppelt werden, um in die Zellen geschleust zu werden, beeinflussen die Aufnahmewege. So erfolgt bei kationischen Konjugaten meist Makropinozytose und bei amphiphatischen Peptiden mit Peptid-

Nukleinsäuren Clathrin-vermittelte Endozytose. [140] Besonders deutlich wird dies bei dem Einsatz des Peptids TAT. Ist ein Protein an diesem Peptid gekoppelt, tritt ein Lipid-raft-vermittelter Mechanismus auf. Ist hingegen ein Fluorophor an dem TAT-Peptid gekoppelt, so erfolgt ein Clathrin-unabhängiger Aufnahmeweg. [147]

Die Aufnahme bei der Endozytose verläuft, indem zunächst Wechselwirkungen zwischen der Zellmembran und der aufzunehmenden Substanz auftreten. [149] Daraufhin verformt sich die Membran, so dass die aufzunehmende Substanz komplett von der Membran eingeschlossen wird. Anschließend wird das entstandene Endosom in das Zytoplasma der Zelle abgeschnürt. [149]

Ein mögliches Problem, welches mit der Aufnahme über Endozytose auftreten kann, ist das Verbleiben der Substanzen innerhalb der Endosomen. Jedoch ist es wichtig für die meisten Anwendungen, dass die Moleküle in das Zytoplasma oder den Zellkern gelangen. Für das Umgehen dieses Problems können verschiedene Moleküle eingesetzt werden, um die Endosomen zu öffnen. Hierzu zählen beispielsweise fusogene Peptide [140] oder Lipide [147], membranstörende Peptide oder Polymere [147], ebenso wie photosensitive Moleküle [140], durch welche die Endosomen rupturieren können. Auch der Einsatz von speziellen Polymeren mit einer Pufferkapazität zwischen pH 5,2 und pH 7,0 können eingesetzt werden. Hierbei erfolgt ein sogenannter Protonen-Schwamm-Effekt, bei dem zunächst ein osmotisches Schwellen erfolgt, wodurch die Endosom-Membran rupturiert. [147]

Bei der direkten Translokation, welche aufgrund von elektrostatischen Wechselwirkungen und Wasserstoff-Bindungen verantwortlich für die Aufnahme kleiner Moleküle ist [147], erfolgt die Aufnahme über die Bildung von inversen Mizellen, Porenbildung in der Membran oder dem „Carpet-Modell“. [140] Bei dem Modell der inversen Mizelle führen die Wechselwirkungen der CPPs mit der Zellmembran zu einer Störung der Lipid-Doppelschicht, dadurch gelangen sie in das Innere des Mizellkerns. Aufgrund von weiteren Wechselwirkungen mit den Membrankomponenten erfolgt eine Destabilisierung der Mizelle und die CPPs gelangen in das Zytoplasma der Zelle. Hierbei ist anzumerken, dass die CPPs und ihre Konjugate nicht mit dem hydrophoben Teil der Lipid-Doppelschicht in Kontakt treten und die Mizellbildung über eine konkav geformte Oberfläche erfolgt. [140]

Bei dem Aufnahmemechanismus über die Bildung von Membranporen wird zwischen fassförmigen und ringförmigen Poren unterschieden. Während beim ersten Typ keine

starke Umstrukturierung der Membran erfolgt, ist dies beim zweiten Typ erforderlich. Hierbei ist die Bildung einer konvex geformten Membranoberfläche die Folge der Wechselwirkungen zwischen CPP und Membran. [140]

Das „Carpet-Modell“ erfordert eine extensive Anbindung der Peptide an die Membranoberfläche, was zu einer Umstrukturierung und schließlich zu der Destabilisierung der Membran führt und somit die Zellpenetration ermöglicht. [140]

Der Aufnahmemechanismus ist unter anderem abhängig von den jeweiligen zellpenetrierenden Peptiden, den angebundenen Substanzen und den Zellen. So konnte beispielsweise für ein NLS-Peptid festgestellt werden, dass es große Moleküle wie DNA und siRNA erfolgreich in Zellen einbringen kann. Für Konzentrationen von 0,1 μM wurde hierbei Endozytose als Aufnahmeweg vermutet, bei Konzentrationen um 1 μM wurde Endozytose hingegen nicht gefunden. [140] Für ein Nona-Arginin konnte diese Konzentrationsabhängigkeit auch gefunden werden, allerdings liegt hierbei die Grenze bei 10 μM , unter der Endozytose als Aufnahme ermittelt wurde. [150] Auch die Anwesenheit von beispielsweise Heparin hemmt die Aufnahme der CPPs. [140]

Die amphiphilen Eigenschaften dieser Peptidspezies wurden auch in anderen Studien als effektiver gegenüber Polyargininen eingestuft, ebenso wie der Einfluss der Nettoladung. Die Abwechslung zwischen anionischen, neutralen und kationischen Aminosäuren verbessert hierbei die Penetration der Zellmembran. [151] Für das Einbringen von Nanopartikeln mit Hilfe von zellpenetrierenden Peptiden ist neben den genannten Faktoren auch die Partikelgröße ein wichtiger Faktor. Hierbei konnten PEG-stabilisierte Goldnanopartikel mit Hilfe des TATp-Peptids bei einer Größe von 2,4 nm im Zellkern gefunden werden, während 5,5 nm bis 8,2 nm große Nanopartikel lediglich im Zytoplasma vorlagen. Nanopartikel mit mindestens 16 nm konnten nicht aufgenommen werden. [147]

3.4. Adsorptionsprozesse auf Nanopartikeln

Adsorption im Allgemeinen beschreibt die Bindung von flüssigen oder gasförmigen Teilchen, als Adsorptiv bezeichnet, auf einer festen Oberfläche, dem Adsorbens. Dabei kann die Bindung zwischen Adsorptiv und Adsorbens unterschiedlicher Art sein, wobei zwischen Physisorption und Chemisorption unterschieden wird. Bei der Physisorption handelt es sich um physikalische Wechselwirkungen wie van-der-Waals-Kräfte, wie es bei der Stabilisierung von Goldnanopartikeln durch Trinatriumcitrat- oder PEG-Moleküle der Fall ist. Erfolgt eine Chemisorption, werden kovalente Bindungen ausgebildet. [152] Bei der Verwendung von thiolisierten Liganden, beispielsweise eines Peptids mit terminalem Cystein, entstehen Bindungen zwischen Gold und Schwefel mit einer Bindungsstärke von 146-188 kJ/mol, was vergleichbar mit einer kovalenten Bindung ist. [18]

Die Anbindung verschiedener Moleküle auf eine feste Oberfläche kann durch unterschiedliche Theorien von Adsorptionsisothermen beschrieben werden. Die am häufigsten genutzten Theorien sind die nach Langmuir, Freundlich und Temkin. Während bei der Langmuir-Isotherme keine Wechselwirkungen zwischen den adsorbierten Molekülen, die Ausbildung einer Monolage und eine homogene Adsorbens-Oberfläche angenommen wird, werden bei der Freundlich-Isotherme Wechselwirkungen der Teilchen miteinander und eine heterogene Oberfläche des Adsorbens angenommen. [153] Auch die Temkin-Isotherme beschreibt ein System, in dem die an der Adsorption teilnehmenden Teilchen miteinander wechselwirken. Außerhalb von sehr großen und sehr kleinen Konzentrationen wird angenommen, dass die Adsorptionseenthalpie linear mit der Bedeckung sinkt. [154] Die Adsorption auf Nanopartikeln erfolgte bereits unter Verwendung verschiedener Liganden, hierbei wurde das Adsorptionsverhalten von beispielsweise DNA-Liganden, L-Cystein und Mercaptoundecansäure durch die Langmuir-Isotherme beschrieben. [155, 156] Der Grund war einerseits das Ausbilden einer Monolage [156] und andererseits das zusätzliche Auftreten von der Desorption. [155]

Die Adsorption auf einem Nanopartikel unterscheidet sich von einer planaren Oberfläche zwar nicht in der Bindungsart der Moleküle auf der Oberfläche, jedoch in der maximal zu erreichenden Beladungsdichte. Die Krümmung der Oberfläche ist dabei ein wichtiger Parameter. Bei sinkender Nanopartikelgröße wird die Krümmung der Oberfläche größer, was weiterhin zu einer erhöhten Beladungsdichte auf dem

Partikel führen kann. [157] Der Grund hierfür ist, dass durch die erhöhte Krümmung der Partikeloberfläche der Ablenkwinkel der Liganden exponentiell steigt und dadurch der Raum zwischen den Liganden vergrößert wird. (Abbildung 9) Die Folge ist eine verringerte Abstoßung, welche insbesondere bei stark negativen Liganden wie Oligonukleotiden zum Tragen kommt. [158] Der Krümmungseffekt ist gültig bis zu einer Partikelgröße von 60 nm, bei dem die Beladungsdichte auf Nanopartikeln der auf einer planaren Oberfläche gleicht. [157] Als erste Abschätzung über die maximal mögliche Partikeloberflächenbeladung kann der Platzbedarf eines Liganden über den sogenannten Footprint K (Formel 5) beschrieben werden, welcher beispielsweise bei einem 10 nm Partikel für ein 25 Basenpaar-Oligonukleotid bei $4,9 \pm 1 \text{ nm}^2$ liegt. [158]

$$K \left(\frac{\text{nm}^2}{n} \right) = \left[\frac{4 \cdot \pi \cdot r^2}{N_r} \right] \quad [158] \quad \text{Formel 5}$$

Mit r = Partikelradius und N_r = mittlere Anzahl an Liganden pro Nanopartikel.

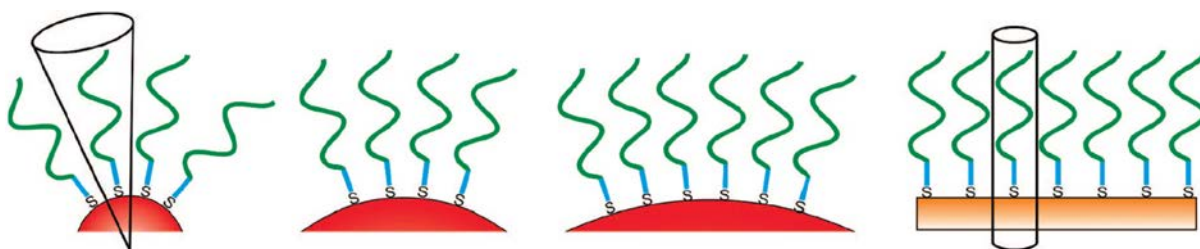


Abbildung 9: Darstellung der Oberflächenbedeckung auf unterschiedlich große Nanopartikel und einer planaren Oberfläche. Adaptiert nach [157].¹⁴

Da die Anbindung von Funktionsmolekülen auf Goldnanopartikel häufig über eine Thiolbindung erfolgt, wird im Folgenden auf den Mechanismus dieser Reaktion eingegangen. Eine wesentliche Frage bei dieser Reaktion ist die nach dem Verbleib des Wasserstoffs aus der Thiolgruppe, nachdem die Gold-Schwefel-Bindung gebildet wurde. Hierzu gibt es verschiedene Erklärungsansätze, die einerseits die Adsorption der intakten Thiolgruppe auf der Nanopartikeloberfläche beschreiben, wobei der Wasserstoff an dem Schwefel gebunden bleiben kann oder auf der Goldoberfläche adsorbieren kann. [159, 160] Andererseits wird angenommen, dass die Schwefel-Wasserstoff-Bindung gebrochen wird und der Wasserstoff sich schließlich entweder an der Metalloberfläche anlagert oder atomar aus der Reaktionslösung entweicht. [161] Bei letzterer Annahme wird weiterhin eine defekte Goldoberfläche angenommen, wie es bei Nanopartikeln vorkommt. [162, 163] Darüber hinaus besteht die Möglichkeit

¹⁴ Adapted with permission from Kristin B. Cederquist and Christine D. Keating. Curvature Effects in DNA: Au Nanoparticle Conjugates. ACS Nano, Vol. 3, No. 2, 256 – 260, 2009. Copyright (2009) American Chemical Society. (<http://dx.doi.org/10.1021/nn9000726>)

einer Kombination der ersten beiden Varianten [159] oder, dass der Wasserstoff intern mit den adsorbierten Teilchen beispielsweise an einer Nitrogruppe reagiert und diese zu einer Aminogruppe reduziert. [164] Ferner ist zu erwähnen, dass bei der Ausbildung der Gold-Schwefel-Bindung der Wasserstoff nicht erforderlich ist, da die Bindung auch ausgehend von Disulfid-Gruppen stattfindet. [164]

Im Folgenden sollen die Adsorption von Oligonukleotiden und zellpenetrierenden Peptiden auf Goldnanopartikel beschrieben werden. CPPs sind in der Regel positiv geladen, wodurch es bei einer Adsorption auf negativ geladene Goldnanopartikel zu einem Ausgleich der Ladungen kommen kann und dadurch zu einer Agglomeration der Partikel. Das komplette Ausfallen der Partikel erfolgt allerdings nur am oder in der unmittelbaren Nähe des isoelektrischen Punktes (IEP) des Systems. Hierbei ist es wichtig, die Nettoladung des zu verwendenden Peptids zu kennen, denn davon hängt die Lage des IEP neben dem Peptid-Nanopartikel-Verhältnis ab. Die Verwendung von stark positiv geladenen Peptiden verschiebt den IEP zu einer geringeren Peptidbeladung und verengt außerdem den Bereich der instabilen und zur Aggregation neigenden Partikelkonjugate. (Abbildung 10) Das Gegenteil ist der Fall, wenn das Peptid eine niedrige Nettoladung besitzt. Dadurch ist einerseits der Arbeitsbereich für insgesamt negative AuNP-Peptid-Konjugate vergrößert, andererseits ist für das Erreichen insgesamt positiv geladener Konjugate eine mindestens 7,5-fach höhere Konzentration notwendig. So aggregieren die Partikel mit einem 3-fach positiv geladenen Peptid ab einer Beladung von etwa 125 pmol/cm², während die Aggregation mit einem 10-fach positiv geladenen Peptid zwischen 160 und 675 pmol/cm² erfolgt. [72]

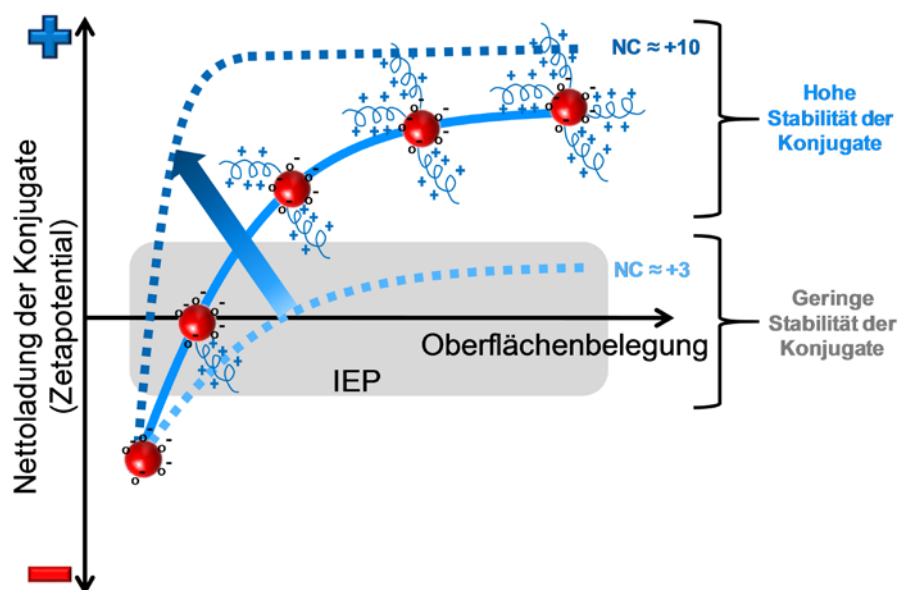


Abbildung 10: Darstellung der Zusammenhänge des Prinzips des Ladungsausgleiches bei der Funktionalisierung von negativ geladenen Goldnanopartikeln mit positiv geladenen Liganden. NC bedeutet hier Nettoladung (engl.: Net-Charge). Adaptiert nach [72].¹⁵

Weiterhin zeigt die Konjugation bei einem pH-Wert, an dem die Struktur des Peptids komplett gestreckt ist und gleichzeitig der Ladungsunterschied zwischen Nanopartikel und Peptid maximal ist, eine bestmögliche Adsorption. Für Penetratin auf Goldnanopartikel ist dies beispielsweise ein pH-Wert von 9. Das liegt einerseits daran, dass die Anziehung der entgegengesetzten Ladungen die Adsorption begünstigt. Andererseits steht durch die gestreckte Konformation des Peptids mehr Platz für weitere Liganden auf der Partikeloberfläche zur Verfügung. [17]

Bei der Adsorption von Oligonukleotiden auf Goldnanopartikel besteht das Problem der Aggregation nicht, da diese eine negative Ladung besitzen. Allerdings gibt es hierbei aufgrund der starken negativen Ladung der Liganden das Problem der gegenseitigen Abstoßung und auch der Abstoßung mit den Nanopartikeln. Durch den Einsatz des „Salt-Aging“ werden die negativen Ladungen abgeschirmt, sodass sich Oligonukleotide und Nanopartikel annähern können und eine effiziente Adsorption stattfinden kann. Das „Salt-Aging“ basiert auf der schrittweisen Zugabe von wässrigen Salzlösungen zu der Nanopartikel-Oligonukleotid-Mischung wie beispielsweise Natriumchlorid. Der Grund für diese Zugabemethode ist der, dass die DNA-Adsorption ein vergleichsweise langsamer Prozess ist und die Nanopartikel andernfalls ausfallen würden. [97] Bei gleichbleibender Salzkonzentration verringert sich die

¹⁵ Adapted with permission from Lisa Gamrad, Christoph Rehbock, Judith Krawinkel, Bayaraah Tumursukh, Alexander Heisterkamp and Stephan Barcikowski. Charge Balancing of Model Gold-Nanoparticle-Peptide Conjugates Controlled by the Peptide's Net Charge and the Ligand to Nanoparticle Ratio. *J. Phys. Chem. C*, 118 (19), 10302 – 10313, 2014. Copyright 2014 American Chemical Society. (<http://dx.doi.org/10.1021/jp501489t>)

Oberflächenbeladung, je länger die zur Adsorption eingesetzten Sequenzen werden. Das liegt daran, dass kurze Sequenzen erstens nicht so stark negativ geladen sind und dadurch die Abstoßung geringer ist und zweitens mehr Liganden eine gestreckte Konformation aufweisen. Lange Sequenzen, wie im Fall von DNA, werden hingegen mit steigender Anzahl an Basen flexibler, knäulen sich zusammen und benötigen dadurch mehr Platz auf der Partikeloberfläche. [33]

Die Verwendung eines Abstandhalters zwischen Oberfläche und DNA-Strang hat verschiedene Einflüsse auf die Oberflächenbeladung und kann unter Umständen den Footprint der DNA-Liganden reduzieren. Wenn der Abstandhalter ebenfalls aus Basen einer Art besteht, treten Wechselwirkungen zwischen den Strängen auf und es tritt der gleiche Effekt wie bei einer Verlängerung der Sequenzen auf. [16, 33] Bei einem Abstandhalter aus Adenin kann sich dieser aufgrund von Wechselwirkungen auf die Oberfläche legen und sie dadurch teilweise blockieren, ein Abstandhalter aus Thymin hingegen wechselwirkt weniger mit der Oberfläche. [165] Die Verwendung von Abstandhaltern aus anderen Molekülen wie Polyethylenglycol (PEG) hat keine Abstoßung mit der Goldoberfläche zur Folge und kann somit die Oberflächenbedeckung um mehr als das Dreifache erhöhen. [16]

Aufgrund der Möglichkeit, die Oberflächenbedeckung von Oligonukleotiden auf Nanopartikeln mit Hilfe der entsprechenden Salzkonzentration einzustellen, bleibt Platz für weitere Funktionsmoleküle. So wurde bereits die bifunktionale Konjugation von Goldnanopartikeln mit Penetratin und einem Aptamer gezeigt. Die Oberflächenbedeckung liegt hier bei 30 pmol/cm² Penetratin und 61 pmol/cm² des Aptamers. [10] Die Herstellung von Nanobiokonjugaten mit einer multifunktionalen Ligandenhülle wird zudem durch die ligandenfreie Oberfläche von lasergenerierten Nanopartikeln und somit der Möglichkeit, eine fünffach höhere Oberflächenbeladung als bei chemisch hergestellten Nanopartikeln zu erreichen, begünstigt. [15]

3.5. Biofunktionalisierung von lasergenerierten Goldnanopartikeln und ihre Verwendung

In den vorhergehenden Kapiteln sind die Funktionalisierungs- und Anwendungsmöglichkeiten von Goldnanopartikeln unabhängig von ihrer Synthesart erläutert worden. Im Folgenden soll hingegen speziell auf die in der Literatur beschriebene Biofunktionalisierung von lasergenerierten Goldnanopartikeln und *In-vitro*-Experimente mit dieser Partikelspezies eingegangen werden.

Als 1993 Kolloidsynthese durch die Laserablation in Flüssigkeiten zum ersten Mal durch A. Henglein und A. Fojtik beschrieben wurde, ist dieser Prozess zunächst in Wasser und Lösungsmitteln durchgeführt worden. [166, 167] Im Zuge der Untersuchung des Laserablationsprozesses und dessen Optimierung bezüglich Produktivität und Partikelstabilität sind organische Substanzen wie Biopolymere, Zucker oder Tenside eingesetzt worden. [83, 84, 168 - 181] Hierbei sind Effekte auf die Nanopartikelgröße ermittelt worden, wodurch die Größeneinstellung durch *In-situ*-Konjugation möglich geworden ist. [83, 84, 168, 177, 181] Ab 2007 sind auch funktionale Biomoleküle und Proteine zur Stabilisierung und Funktionalisierung von lasergenerierten Goldnanopartikeln eingesetzt worden. Hierbei hat V. Amendola die Oberflächenbedeckung von BSA auf 4 nm und 15 nm Partikel untersucht. Für die kleineren Partikel ist eine Belegung von 10^2 BSA/AuNP und für die größeren Partikel von 10^5 BSA/AuNP ermittelt worden. [28]

Darüber hinaus wird die Anbindung von spezifischeren Liganden wie Oligonukleotide und Peptide beschrieben. Hierbei wird zunächst die *In-situ*-Funktionalisierung eingesetzt und dabei sowohl die Produktivität der Partikelherstellung als auch die Degradation der Biomoleküle durch die Laserstrahlung untersucht. [29, 30, 31] Neben der Vermeidung von Degradation durch die Variation der Laserparameter, wie der Fokusposition und der Pulsenergie, wird auch die Prozessweise verändert. Die Abtragskammer in einem stationären Prozess wird durch einen Durchflussreaktor ersetzt, in dem zunächst ebenfalls *in situ* konjugiert wird. [32]

Im weiteren Verlauf der Optimierung erfolgt weiterhin eine zu der Partikelablation zeitverzögerte Funktionalisierung, „*fast ex situ*“ und „*ex situ*“ genannt. [10, 18] Aus diesen Experimenten resultiert, dass die *Fast-ex-situ*-Konjugation von lasergenerierten Goldnanopartikeln, welche 0,2 Sekunden nach der Ablation erfolgt, zu einer bis zu 50% höheren Oberflächenbelegung führt als die *Ex-situ*-Konjugation.

Hierbei findet die Konjugation erst zwei Minuten nach der Partikelgenerierung statt. [18] Auch beim Vergleich zwischen *Ex-situ*- und *In-situ*-Konjugation wird gezeigt, dass letzteres zu einer viermal höheren Konjugationseffizienz führt. [15] Dies kann durch die erhöhte Reaktivität der Partikeloberfläche unmittelbar nach der Synthese erklärt werden. Der Vergleich mit chemisch hergestellten AuNP-Oligonukleotid-Konjugaten, bei denen zunächst ein Ligandenaustausch erforderlich ist, weist eine fünfmal höhere Oberflächenbeladung für die Konjugate mit lasergenerierten Goldnanopartikel auf. [15] Schließlich folgte 2012 eine systematische Studie zum Einfluss von Abstandhaltern in Oligonukleotid-Sequenzen und deren Länge auf die Konjugationseffizienz bei ligandenfreien Goldnanopartikeln. Das Resultat ist eine 50% höhere Effizienz bei der Verwendung von Sequenzen ohne Abstandhalter, was auf die daraus folgende kürzere Sequenzlänge zurückzuführen ist. [33]

Nachdem der Funktionalisierungsprozess von ligandenfreien Goldnanopartikeln umfassend unter Verwendung verschiedener Oligonukleotide untersucht worden ist, sind außerdem Peptide eingesetzt worden. [10, 17, 18] Hierbei wird einerseits die pH-Wert-abhängige Konjugationseffizienz von Penetratin untersucht, welche sich mit steigendem pH-Wert erhöht. [17] Andererseits werden von A. Barchanski et al. erstmals bifunktionale Goldnanopartikel-Konjugate mit Oligonukleotiden und Peptiden hergestellt. Hierbei wird gezeigt, dass auch bei multifunktionalen Konjugaten sowohl die Konjugationseffizienz als auch die Oberflächenbeladung der Biomoleküle auf AuNPs kontrolliert werden können. Diese Experimente sind jedoch lediglich bei zwei Konzentrationsverhältnissen durchgeführt worden. [10]

2009 wurden erstmals lasergenerierte Goldnanopartikel in *In-vitro*-Experimenten eingesetzt. Dies erfolgte durch die Arbeitsgruppe um H. Escobar. [34, 35] Hier werden ligandenfreie Goldnanopartikel in verschiedenen Größen zu dem Standardprotokoll zur Transfektion von Epithelzellen des Hundes gegeben, um die Transfektion zu verbessern. Bei diesen Experimenten ergibt sich eine größenabhängige Verbesserung der Transfektion, wobei die höchste Transfektionseffizienz mit $50 \pm 10\%$ für 60 nm Partikel gezeigt wird. Diese ist sechsmal so hoch wie bei dem Standardprotokoll mit Transfektionsreagenzien. [34] Im Vergleich mit chemisch hergestellten Goldnanopartikeln ergeben sich für die ligandenfreien AuNPs zum einen unter Verwendung des pIRES-hrGFP11-*rHMGB1*-Vektors doppelt so hohe Werte der Transfektionseffizienz, dabei jedoch auch eine um den Faktor 1,5-2,0 erhöhte

Toxizität. Für die Transfektion des pIRES-hrGFP^{II}-EIL-12-Vektors hingegen ist die Transfektionseffizienz der beiden Partikelspezies ähnlich, die Toxizität der lasergenerierten Partikel ist jedoch um das Vierfache geringer. [35] Wie bereits in Kapitel 3.1 erwähnt, hängt die Toxizität umgekehrt proportional mit der Transfektionseffizienz zusammen. Weiterhin gibt es Abhängigkeiten von den verwendeten Zellen und zu transfizierenden DNA-Spezies. [54]

Mit der Anbindung von funktionalen Biomolekülen an lasergenerierte Goldnanopartikel und der Möglichkeit, die Oberflächenbedeckung der Nanopartikel gezielt einzustellen, werden folglich auch Anwendungen beschrieben, in denen die Konjugate eingesetzt werden.

In den Anfängen der *In-vitro*-Experimente mit lasergenerierten Goldnanopartikel-Konjugaten ist eine Studie zur Aufnahme von AuNP-Polymer-Konjugaten in Krebszellen zu nennen. Hierbei wird ein thermoresponsives Polymer eingesetzt, welches bei Temperaturerhöhung die Aggregation der Partikel begünstigt. Demnach tritt bei höherer Temperatur von 40°C eine verbesserte Aufnahme dieser Konjugate in die Krebszellen auf. [36]

Des Weiteren sind Experimente bezüglich der Aufnahme von Goldnanopartikeln in bovine Endothelzellen erfolgt. Hierbei wird beobachtet, dass die ligandenfreien Goldnanopartikel in die Zellen und das Zytoplasma aufgenommen werden. Die Aufnahme der Partikel steigt abhängig von der Inkubationsdauer bis auf etwa 80% an (48 h). [37, 38]

In dem Jahr 2011 ist die Idee der nanopartikelbasierten Markierung von Rinderspermien formuliert worden, an welche die vorliegende Arbeit ein Jahr später anknüpft. Hierbei sollen Y-Chromosom-spezifisch funktionalisierte Goldnanopartikel in Rinderspermien aufgenommen werden und an dem Genom der männlichen Spermien hybridisieren. Dies soll schließlich zu einer spezifischen Akkumulation der Nanopartikel und dadurch zu einer Rotverschiebung der SPR-Bande führen. [39]

4. Ergebnisse und Diskussion

Im Folgenden werden die Ergebnisse dieser Arbeit dargestellt. Sie gliedern sich, wie in Abbildung 11 dargestellt, in vier Hauptaspekte: 1) Herstellung und Optimierung von monodispersen Goldnanopartikeln als Ausgangsmaterial, 2) Design von Goldnanopartikel-Konjugaten, welche mit verschiedenen Ligandentypen hergestellt wurden, und anschließende Untersuchung bezüglich ihrer Stabilität und Oberflächenbedeckung, 3) Analyse der hergestellten Konjugate auf ihre biologische Kompatibilität und extrazelluläre Funktionalität sowie 4) Einsatz der Konjugate in biologischen Untersuchungen.

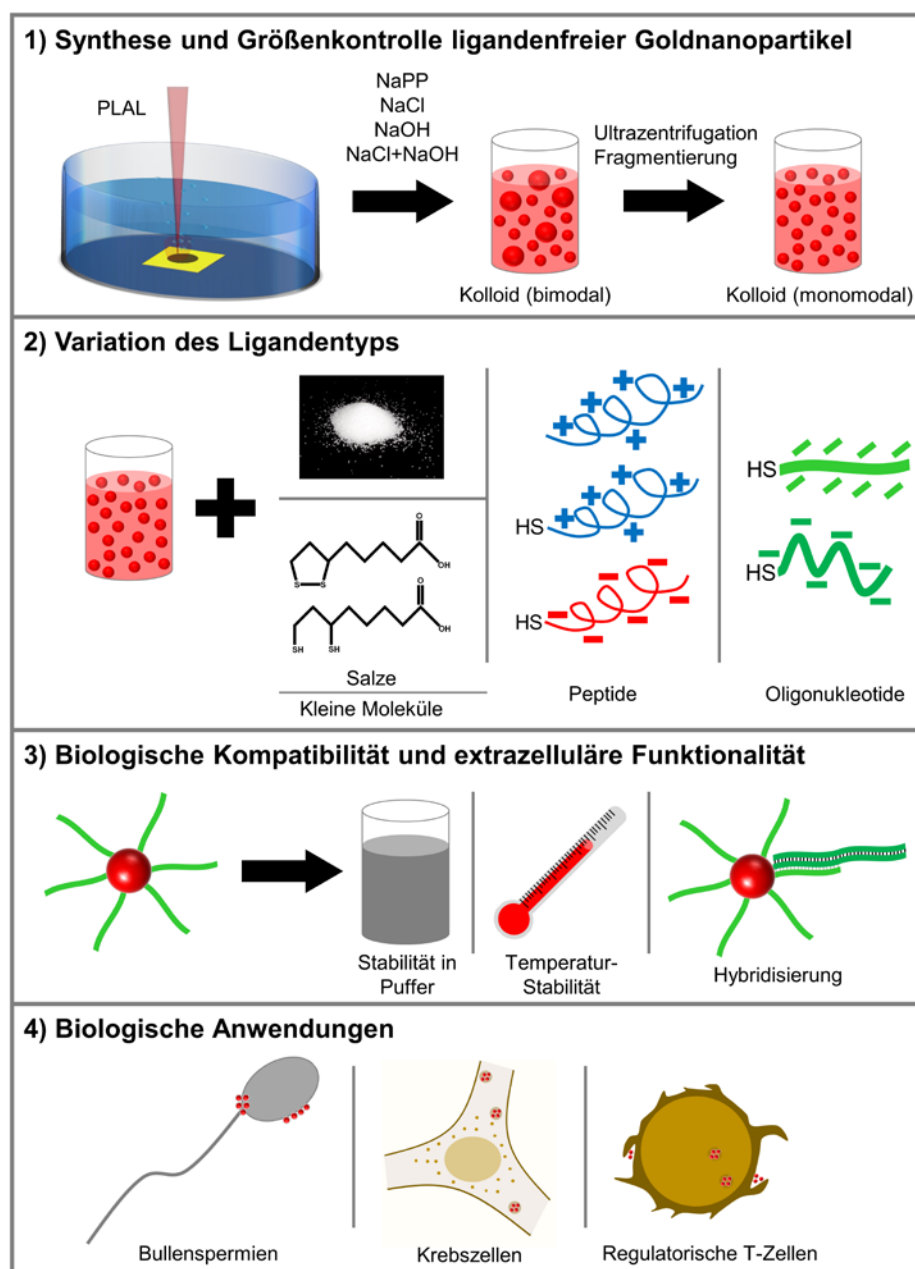
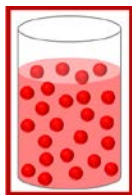


Abbildung 11: Übersicht der durchgeführten Experimente, welche in dem Kapitel „Ergebnisse und Diskussion“ beschrieben und diskutiert werden.

4.1. Synthese und Größenkontrolle ligandenfreier Goldnanopartikel



Optimierung der Bedingungen des Abtragsmediums

Ein Ziel dieser Arbeit war es, ein geeignetes Ausgangsmaterial für die Herstellung biologisch einsetzbarer Nanopartikel-Konjugate bereit zu stellen. Lasergenerierte Goldnanopartikel stellen für diese Fragestellung aufgrund verschiedener Aspekte ein ideales Material dar. Zum einen gelten Goldnanopartikel als wenig toxisch und daher als biokompatibel [7, 8, 9], zum anderen sind sie mittels Thiol-Bindung problemlos zu funktionalisieren. [18] Weiterhin bietet der Prozess der Laserablation die Möglichkeit zur Herstellung reiner Nanopartikel ohne stabilisierende Liganden auf der Oberfläche. [61] Dies ermöglicht den Ausschluss von Kreuz-Effekten und demzufolge eine genaue Analyse der bei der Biofunktionalisierung auftretenden Ergebnisse. Dies ist bei der Funktionalisierung mit verschiedenen Ligandentypen essentiell. Zudem können auch maßgeschneiderte Konjugate hergestellt werden, bei denen die Menge und die Verhältnisse der auf der Nanopartikeloberfläche befindlichen Liganden bekannt sind.

Bei der Herstellung der Goldnanopartikel mittels Laserablation erfolgte eine Beschränkung bezüglich des Abtragsmediums auf wässrige Medien, da die Nanopartikel-Konjugate im weiteren Verlauf der Arbeit für biologische Testungen eingesetzt werden sollen. Weiterhin wurde ein monomodales, monodisperses Kolloid mit enger Größenverteilung angestrebt, da dies ebenfalls die Bewertung der Effekte vereinfacht. Die Herstellung des Kolloids sollte insbesondere in Größe und Stabilität reproduzierbar sein.

Für diesen Zweck eignet sich der Einsatz von Elektrolytlösungen, da diese die Möglichkeit bieten, die Größe und auch die Größenverteilung der Nanopartikel zu reduzieren. [72, 73] Aufgrund von Voruntersuchungen innerhalb der Arbeitsgruppe (L. Gamrad [72], V. Merk [85], G. Marzun [182]) wurden vier verschiedene Abtragsmedien für die ersten Untersuchungen ausgewählt. Dies waren wässrige Lösungen mit 600 μM Natriumphosphatpuffer (NaPP), 100 μM Natriumchlorid, eine pH 10 Natronlauge sowie eine Mischung aus 100 μM Natriumchlorid und pH 10 Natronlauge. Bei der Betrachtung der relativen Oberflächenhäufigkeit der Kolloide, welche mittels analytischer Scheibenzentrifuge gemessen wurde (Abbildung 12 A), ist zu erkennen, dass der Hauptpeak aller Verteilungen unterhalb von 10 nm ist. Die Oberflächenhäufigkeit wurde hierbei verwendet, da die nachfolgende Biokonjugation

vor allem von der Oberfläche der Partikel bestimmt wird. Weiterhin weisen die Kolloide eine enge Verteilung mit einer Halbwertsbreite von 2,0 nm für das Kolloid, welches in NaCl und NaOH abgetragen wurde, und 1,7 nm für den Abtrag in NaPP und dem Gemisch aus NaCl und NaOH auf. Ein Kolloid, welches in MilliQ-Wasser (ohne Additive) abgetragen wird, weist einen Peak zwischen 5 nm und 100 nm mit einer Halbwertsbreite von 31,7 nm (Anhang: Abbildung 90) auf. Des Weiteren besitzen alle Varianten eine zweite Mode zwischen 10 nm und 100 nm. Hierbei liegt bei der Verwendung des Natriumphosphatpuffers eine deutliche Trennung zur ersten Mode vor. Dies ist an dem ausgeprägten Plateau in der kumulativen Oberflächenverteilung (Abbildung 12 B) erkennbar. Das Kolloid in 100 μM NaCl zeigt ebenfalls eine Trennung der beiden Moden, während bei den Varianten mit Natronlauge die zweite Mode als Ausläufer oder Schulter der ersten Mode gedeutet werden kann.

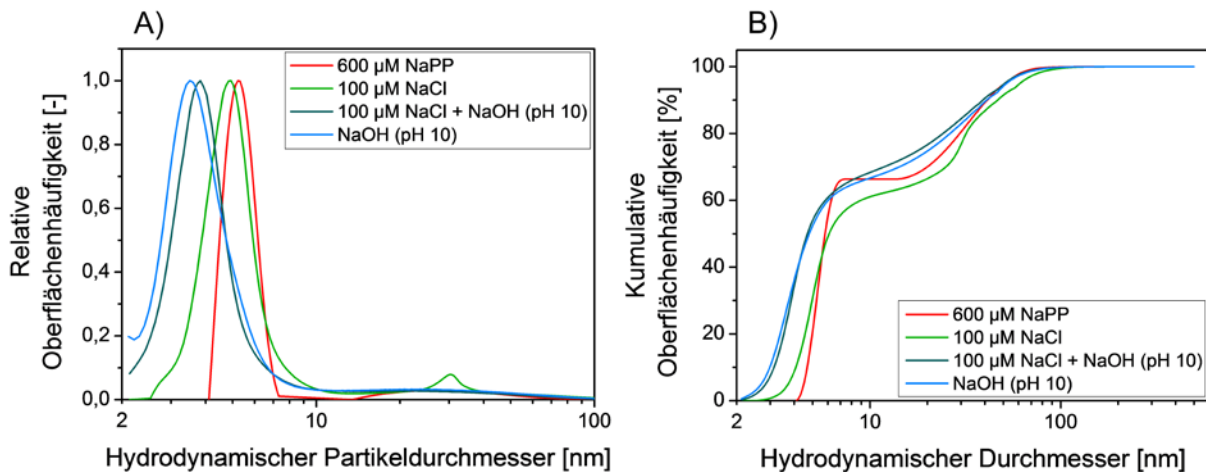


Abbildung 12: Größeneinstellung von Goldnanopartikeln. Relative (A) und Kumulative (B) Oberflächenverteilungen der Goldnanopartikel hergestellt in verschiedenen Abtragsmedien.

Die Reduktion der Größe und der Größenverteilung der Partikel ist auf ein Größenquenching, aufgrund der eingesetzten Salze, zurückzuführen. [73] Hierbei stabilisieren die vorhandenen Anionen die Nanopartikel unmittelbar nach der Entstehung durch die Laserablation gegen Koaleszenz und Wachstum. Ist die Menge der Ionen im Verhältnis zur Anzahl an Nanopartikeln zu gering, entstehen zum einen größere Nanopartikel und zum anderen bilden sich polydisperse Proben. (Kapitel 3.2; Abbildung 6)

Hierbei muss zwischen einem pH-abhängigen Effekt, welcher bei NaPP und NaOH auftritt, und einem ionenspezifischen Effekt des Chlorids unterschieden werden. Während letzteres von einer spezifischen Adsorption des schwach hydratisierten Chlorids ausgeht [85], werden bei der Annahme des pH-Effekts die Hydroxygruppen

an der Partikeloberfläche deprotoniert. Dies führt zu einer Erhöhung der Ladung und somit zur Partikelstabilisierung. [73] Das Auftreten der bimodalen Verteilung, welche unter anderem bei der Verwendung des NaPP zu erkennen ist, kann auf den Herstellungsprozess mittels Pikosekunden-Lasers zurückgeführt werden. Einerseits entstehen bereits bei der Laserablation Partikel aus zwei Größenordnungen. Hierunter fallen die Primärpartikel einer Größe unter 10 nm und Agglomerate in dem Bereich von 20-60 nm. [80, 81, 183] Andererseits kann auch der Einfluss der *in situ* verwendeten Anionen die Bimodalität hervorrufen. In diesem Fall ist die Menge an Anionen in der Probe nicht ausreichend, um alle Nanopartikel gleichmäßig gegen Koaleszenz und Wachstum abzuschirmen. Dadurch können polydisperse Partikelgrößenverteilungen entstehen. [73]

Aufgrund der deutlicheren Trennung der beiden auftretenden Moden größer und kleiner 10 nm wurden die Kolloide, welche in 600 μ M NaPP und 100 μ M NaCl hergestellt wurden, für weitere Optimierungsversuche ausgewählt. Für eine zuverlässige und reproduzierbare Analyse der Oberflächenbedeckung und Konjugateigenschaften nach der Biofunktionalisierung der Goldnanopartikel ist es wichtig, eine monomodale Partikelverteilung einzusetzen und daher die zweite Mode in den Kolloiden zu entfernen. Für dieses Vorgehen ist das Verfahren der Fragmentierung und die Ultrazentrifugation eingesetzt worden. Bei der Fragmentierung werden die Partikel der zweiten Mode von etwa 50 nm durch die Laserbestrahlung bei einer Wellenlänge von 532 nm zerkleinert. Durch die Ultrazentrifugation werden die Partikel der zweiten Mode abgetrennt. Aufgrund der unterschiedlichen Verfahren zur Nachbehandlung ist der Massenverlust ein wichtiges Kriterium. Bei der Ultrazentrifugation beträgt die Reduktion der eingesetzten Masse aufgrund der Partikelabtrennung 56-66%. (Anhang: Abbildung 93 D) Der zeitliche und arbeitstechnische Aufwand ist in beiden Verfahren vergleichbar.

Abbildung 13 A und B zeigen die kumulativen Verteilungen der Kolloide nach dem Rohabtrag, der Fragmentierung und der Ultrazentrifugation für das Abtragsmedium mit 600 μ M NaPP (A) und 100 μ M NaCl (B). Es ist zu erkennen, dass bei beiden Methoden und auch bei beiden Kolloidvarianten die Menge der großen Partikel (> 10 nm) in der zweiten Mode verringert wird. Die Nachbehandlung des Kolloids mit NaCl mittels Ultrazentrifugation weist eine geringe Verschiebung von ~ 1 nm zu kleineren Partikelgrößen auf, jedoch ist auch eine gering ausgeprägte Schulter in der kumulativen Verteilung zu erkennen. Dies deutet darauf hin, dass der zweite Peak

nicht vollständig abgetrennt werden konnte. Die Abtrennung der Partikel größer 10 nm erfolgt bei diesem Ausgangskolloid nicht effektiv. Das Kolloid ist noch immer bimodal. Bei der Fragmentierung ist ebenfalls eine leichte Verschiebung zu kleineren Partikelgrößen (<1 nm) sichtbar, jedoch wird hierbei auch kein monomodales Kolloid erhalten.

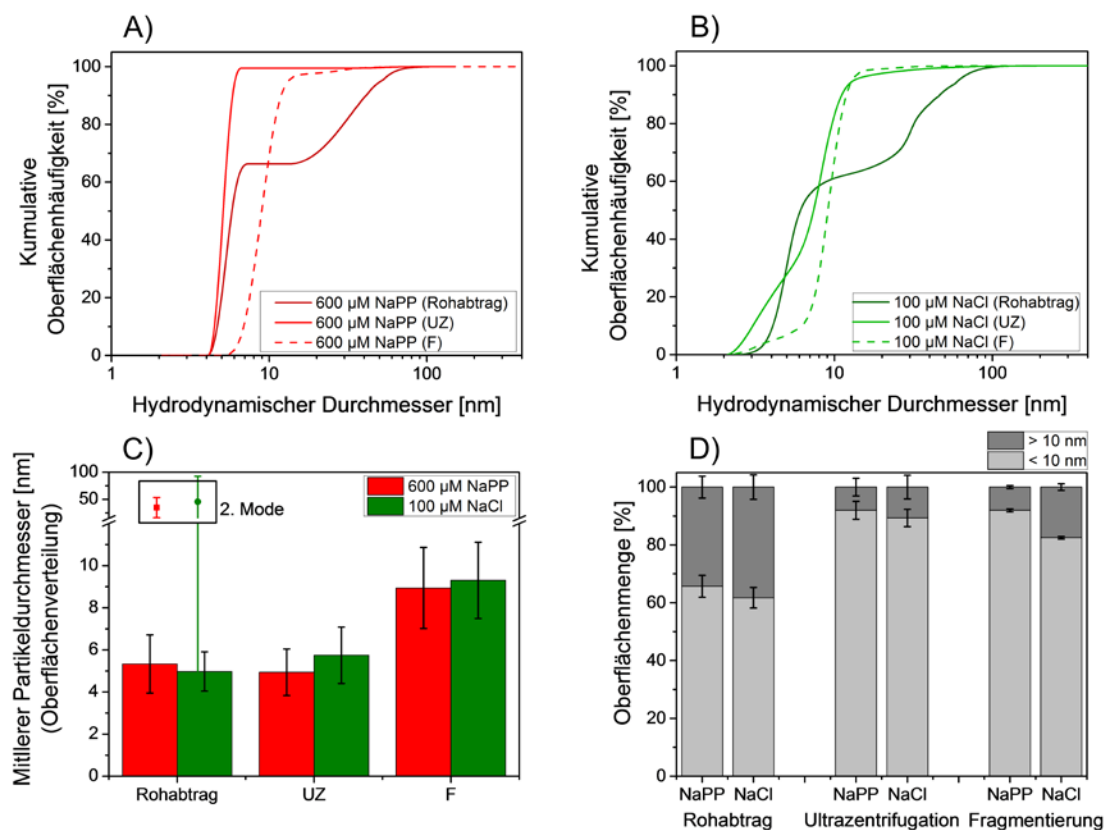


Abbildung 13: Größeneinstellung von Goldnanopartikeln. Vergleich der Rohabträge mit den ultrazentrifugierten und fragmentierten Proben. Kumulative Oberflächenverteilungen der Goldnanopartikel, welche in 600 μ M Natriumphosphatpuffer (A) und 100 μ M Natriumchlorid (B) hergestellt wurden. Darstellung des mittleren Partikeldurchmessers von Goldnanopartikel, welche in 600 μ M Natriumphosphatpuffer und 100 μ M Natriumchlorid hergestellt wurden.¹⁶ (C); Darstellung der prozentualen Oberflächenmenge größer und kleiner 10 nm in einem Kolloid der genannten Proben. (D)

Der Vergleich mit der Nachbehandlung des entsprechenden Ausgangskolloids in NaPP zeigt bei beiden Methoden eine effektive Entfernung der zweiten Mode, wobei jedoch bei der Fragmentierung eine Verschiebung des Peaks um ca. +3 nm zu verzeichnen ist. Diese Effekte sind ebenfalls bei der Betrachtung der mittleren Partikelgröße (Abbildung 13 C) zu erkennen. Weiterhin ist an den Fehlerbalken zu sehen, dass die Reproduzierbarkeit bei allen Proben gleich ist. Aus der Darstellung der Oberflächenmenge der Kolloide (Abbildung 13 D) wird deutlich, dass in allen

¹⁶ Die in Abbildung 13 C dargestellten Daten wurden anhand einer lognormal-Anpassung der Oberflächenverteilungen der Rohabträge und der ultrazentrifugierten und fragmentierten Proben ermittelt.

Proben auch nach der Fragmentierung oder Ultrazentrifugation noch ein Anteil an Partikeln größer 10 nm im Kolloid vorhanden ist. Durch die Nachbehandlung wird dieser zwar drastisch um 26% für das Kolloid in NaPP und um 21-28% für das Kolloid in NaCl reduziert, jedoch weisen die Kolloide in NaPP den geringsten Anteil (8%) an Partikeln > 10 nm auf.

Der Grund dafür, dass eine komplette Entfernung der zweiten Partikelmode nicht erreicht wird, kann im Falle der Ultrazentrifugation zum einen auf den Übergang zwischen den zwei Moden im Ausgangskolloid zurückzuführen sein. Zum anderen können beim manuellen Abnehmen des Überstandes Partikel aus dem abzentrifugierten Teil aufgewirbelt werden und somit in den Überstand gelangen. Bei der Fragmentierung kann es daran liegen, dass der Prozess in einem Probengefäß durchgeführt wurde. Die Probe wurde hierbei nicht komplett ausgestrahlt, wodurch die Partikelmenge ungleichmäßig fragmentiert wurde. Darüber hinaus ist ein 100%-iger Umsatz der großen Partikel nur schwer zu erreichen, wobei die Partikel idealerweise 60 nm betragen. Sind die Partikel kleiner, erfolgt die Fragmentierung weniger effizient. [184] Zusätzlich hierzu ist die Vermischung mittels Magnetrührstäbchen unzureichend. Auch eine Anlagerung der Partikel an dem Rührstäbchen ist denkbar, so dass der Prozess in diesem Fall ineffektiv ist. Anhand der Fragmentierung wird zudem ersichtlich, dass die deutlich getrennten Moden der in NaPP hergestellten Partikel zu einer effektiveren Abtrennung führen und deshalb die Beschaffenheit des Ausgangskolloids einen ausschlaggebenden Einfluss auf das aus der Nachbehandlung resultierende Kolloid hat.

Neben der Größenverteilung ist auch die Qualität des Kolloids ein zu beachtender Aspekt, da die Partikel stabil und lagerungsfähig sein sollen. Unter Qualität wird in diesem Zusammenhang die Polydispersität der Probe verstanden. Dies kann mittels Primärpartikelindex (PPI) und der Lage des SPR-Peaks (Abbildung 14) charakterisiert werden. Sowohl nach der Fragmentierung als auch nach der Ultrazentrifugation steigt der Primärpartikelindex im Vergleich zu dem Rohabtrag an. Dies deutet auf ein Kolloid mit einer reduzierten Anzahl an großen Partikeln hin. [72] Die Lage des SPR-Peaks bestätigt dies, weil sie durch die Nachbehandlung zu kürzeren Wellenlängen verschoben wird. Während der PPI lediglich zwischen *Groß* und *Klein* unterscheidet und ein Hinweis auf eine polydisperse Probe sein kann, ist die Lage des SPR-Peaks außerdem größenspezifisch. [66] Im Vergleich der Ultrazentrifugation mit der Fragmentierung weist letzteres für beide Proben einen höheren PPI auf, dies ist auf

einen geringeren Anteil der großen Partikel > 10 nm zurückzuführen, jedoch unterliegt die Lage der SPR-Peaks Schwankungen. Dies verringert die Reproduzierbarkeit der Partikelherstellung.

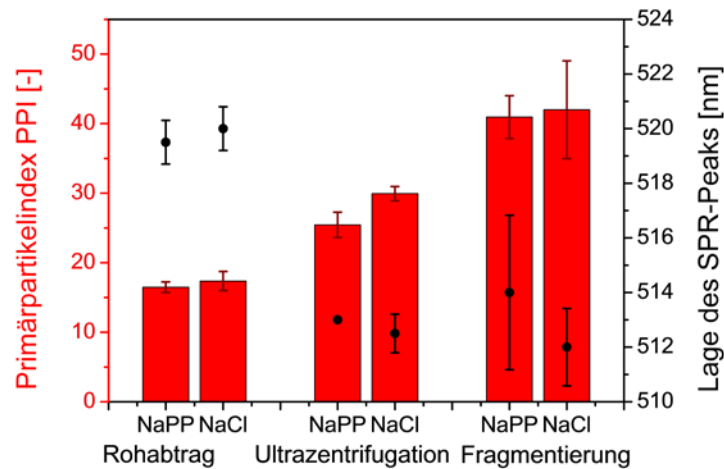


Abbildung 14: Primärpartikelindex und Lage des SPR-Peaks der in 600 μM Natriumphosphatpuffer und 100 μM Natriumchlorid hergestellten Goldnanopartikel. Es werden die Daten der Rohabträge, der ultrazentrifugierten und fragmentierten Proben verglichen.

Der Vergleich zwischen Ultrazentrifugation und Fragmentierung zeigt, dass der Primärpartikelindex für die fragmentierten Proben zwar größer ist, jedoch ist die mittlere Partikelgröße der ultrazentrifugierten Proben deutlich kleiner und die Reproduzierbarkeit, welche an den statistischen Fehlern des PPI und SPR-Peaks zu erkennen ist, ist besser. Demnach weist die Ultrazentrifugation bezüglich der Abtrennung der Partikel > 10 nm im Gesamtzusammenhang bessere Ergebnisse für die nachbehandelten Kolloide auf. Die Partikel werden effektiv abgetrennt und es resultiert ein Kolloid mit monomodaler, monodisperser Größenverteilung, welches in seiner Qualität verbessert wurde. Der Nachteil des Massenverlustes an Gold (Anhang: Abbildung 93 D) ist in diesem Fall zu vernachlässigen, da auch nach der Zentrifugation eine Konzentration vorliegt, welche etwa das Zweifache der für die Biokonjugation benötigten Menge beträgt. Zudem wird die Herstellung der Nanopartikel in 600 μM NaPP gewählt, da hierdurch eine optimale Trennung der Partikel erhalten wird.

Charakterisierung, Reproduzierbarkeit und Langzeitstabilität des Ausgangskolloids

Das ausgewählte Kolloid wurde näher bezüglich Ladung, Größe und Stabilität charakterisiert, um die bei der Biofunktionalisierung auftretenden Effekte klarer einordnen zu können. Monomodale Goldnanopartikel in 600 μM Natriumphosphatpuffer haben bei einem pH-Wert von 7 und 25°C ein Zetapotential von $-37,3 \pm 3,7$ mV (Abbildung 15 A). Dies gilt entsprechend des theoretisch minimal erforderlichen Zetapotentials von ± 25 mV [96], welches auf dem Zusammenhang der thermischen Spannung¹⁷ basiert, als stabiles Kolloid. Bei der Verringerung des pH-Wertes erhöht sich das Zetapotential des Kolloids, dies entspricht der betragsmäßigen Reduktion des Zetapotentials. Dadurch wird der isoelektrische Punkt (IEP) erreicht. An diesem Punkt beträgt das Zetapotential des vorliegenden Systems 0 mV [185], weshalb die Partikel aggregieren und ausfallen. Für das ausgewählte Kolloid liegt der IEP bei einem pH-Wert von 1,33. Im Vergleich hierzu liegt der IEP des Rohabtrags in NaPP bei pH 1,36 und in MilliQ-Wasser bei pH 2,01. (Abbildung 15 A)

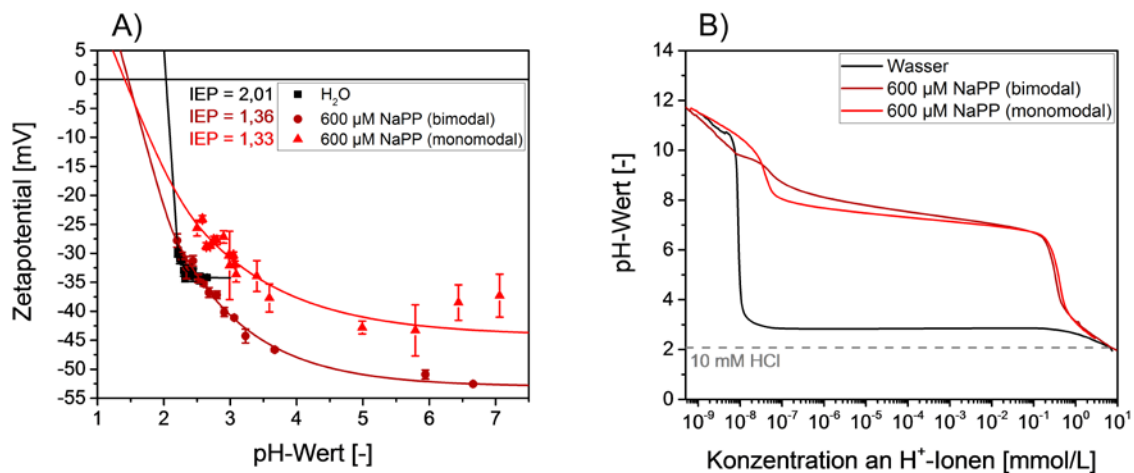


Abbildung 15: Titrationskurve zur Ermittlung des isoelektrischen Punktes von bimodalen und monomodalen Goldnanopartikeln. (A); Titrationskurve der beiden Goldnanopartikel-Kolloiden mit Salzsäure und Natronlauge zur Ermittlung eines Puffereffektes der Nanopartikel. (B)

Der Unterschied des Rohabtrags und der nachbehandelten Probe in NaPP ist nur geringfügig und liegt in der Fehlertoleranz des Messgerätes von $\pm 0,02$. Jedoch führt die Herstellung der Nanopartikel in einer Elektrolytlösung zu einer verbesserten Stabilität, da der IEP der Kolloide in NaPP zu kleineren pH-Werten im Vergleich zu dem Kolloid in Wasser verschoben wird. Hierdurch ergibt sich ein größeres Arbeitsfenster für pH-Wert-abhängige Experimente. Weiterhin ist bei der Zugabe an

¹⁷ Die thermische Spannung V_T wird berechnet über $V_T = \frac{k_B \cdot T}{e}$ [96] mit k_B = Boltzmann-Konstante, T = Temperatur, e = Elementarladung.

H⁺-Ionen durch Salzsäure zu den ligandenfreien Goldkolloiden ein Puffereffekt im Bereich von pH 6,5 und pH 8,4 ersichtlich (Abbildung 15 B), welcher an dem entstandenen Plateau in den Titrationskurven zu erkennen ist. Dieser Pufferbereich weicht von dem in der Literatur beschriebenen Wert von pH 6,5 ab, was jedoch auf die bei der Synthese eingesetzten Elektrolyte zurückzuführen ist. [95]

Aus dem Pufferverhalten von AuNPs kann für dieses System geschlossen werden, dass in diesem pH-Bereich der Übergang zwischen den deprotonierten Au-O⁻- und Au-OH-Gruppen auf der Goldnanopartikeloberfläche erfolgt. [82, 83, 84, 186] Da die Goldnanopartikel jedoch in Natriumphosphatpuffer hergestellt wurden, muss bei dieser Betrachtung auch der Einfluss des Puffers selbst beachtet werden. Hierbei ist anzumerken, dass der Verlauf der pH-Kurve der Nanopartikel ähnlich verläuft wie die Kurve des Puffers. (Anhang: Abbildung 97) Allerdings treten in den Randbereichen Abweichungen auf, was darauf schließen lässt, dass der Pufferbereich der Goldnanopartikel in einem kleineren Konzentrationsbereich auftritt.

An der Steigung der Titrationskurve ober- und unterhalb des Puffer-Bereiches ist weiterhin zu erkennen, dass der Überschuss an Hydronium-Ionen bei pH < 6,5 einen stärkeren Einfluss auf die Goldnanopartikel hat als der Überschuss an Hydroxygruppen bei pH > 9. Die Änderung des pH-Wertes ist hierbei ausgeprägter im Vergleich zu der Änderung der Konzentration an H⁺-Ionen. Dies kann auf die Annäherung an den IEP der Partikel zurückgeführt werden, da durch die Zugabe der H⁺-Ionen die Ladung und dadurch auch die Stabilität der Nanopartikel verringert wird. [17]

Des Weiteren kann aus dem Pufferbereich auch der pKs-Wert der Partikel bestimmt werden. Dies erfolgt unter der Annahme, dass am Halbäquivalenzpunkt der Titrationskurve die Hydroxygruppen und die zugegebenen H⁺-Gruppen, welche sich auf der Nanopartikeloberfläche befinden, in gleicher Menge vorliegen. [187] Dieser befindet sich bei dem Vorliegen der Partikel in Wasser bei pKs = 2,8. Der Rohabtrag in NaPP weist einen pKs-Wert von 7,7 auf und die nachbehandelte Probe einen pKs-Wert von 7,4 auf. Auch dies ist wieder ein Indiz dafür, dass der Puffereffekt der Goldnanopartikel auf dem Natriumphosphatpuffer, welcher bei der Synthese eingesetzt wird und einen pKs-Wert von 7,2 besitzt [188], basiert. Der Pufferbereich der Kolloide in NaPP erstreckt sich über einen pH-Bereich von ±1,9 (nachbehandelt)

und $\pm 2,9$ (Rohabtrag). Dieser Puffereffekt im neutralen Bereich ist vorteilhaft für die Verwendung in biologischen Experimenten, da hierbei in den meisten Fällen in neutralem Medium (pH 7) gearbeitet wird.

Schließlich wurde mit dem Goldkolloid, welches in 600 μM NaPP abgetragen und durch Ultrazentrifugation nachbehandelt wurde, eine Langzeituntersuchung über 13,5 Monate durchgeführt. (Abbildung 16) Die Partikel wurden bezüglich ihrer optischen Eigenschaften, ihrer Größe und ihrer Ladung untersucht. Im ersten Monat ist bei allen Analysemethoden keine signifikante Veränderung der Partikel zu erkennen. Jedoch ist im weiteren Verlauf der Messung eine Änderung insbesondere der monomodalen Partikel zu erkennen. Der Primärpartikelindex der Partikel aus dem Rohabtrag ist unter Berücksichtigung von Schwankungen im Allgemeinen nahezu konstant und sinkt um - 5 über den gesamten Messzeitraum von 13,5 Monaten. Der PPI der monomodalen Probe hingegen nähert sich dem PPI des Rohabtrags an, wie es bereits nach etwa 150 Tagen (5 Monate) der Fall ist. Die Verschiebung des SPR-Peaks der monomodalen Probe weist nach 13,5 Monaten eine deutliche Verschiebung von 10 nm auf. Nach 100 Tagen (3,3 Monate) liegt diese lediglich bei 3,5 nm. Bei dem Rohabtrag ist eine Verschiebung von maximal 2 nm zu verzeichnen.

Die Messung des Zetapotentials weist die gleichen Tendenzen auf. Auch hierbei ist eine Annäherung der Zetapotential-Werte der beiden Proben zu erkennen. Die Größenmessung der Partikel mittels DLS, welches sensitiv die Anwesenheit großer Partikel misst, zeigt hingegen eine über den gesamten Zeitraum konstante Größe der Partikel des Rohabtrags von etwa 75 nm. Dies entspricht der Erwartung, da bei dieser Messmethode die kleineren Primärpartikel nicht detektierbar sind. Die Größe der nachbehandelten Partikel hingegen nimmt nach 13,5 Monaten um 7 nm zu. Hierbei ist anzumerken, dass bereits 20% des Wachstums nach 2 Wochen erfolgt ist. Dies deutet auf ein schnelles Wachstum nach der Herstellung der Partikel hin, welches anschließend langsamer wird. Die Messwerte der hier dargestellten Anzahlverteilung unterscheiden sich nicht von der Volumenverteilung. (Anhang: Abbildung 99 A)

Die verschiedenen Methoden zeigen, dass sich die Eigenschaften der Nanopartikel aus dem Rohabtrag nur geringfügig ändern. Es liegen zwar einige Schwankungen vor, diese können jedoch auf verschiedene, äußere Einflüsse wie beispielsweise Temperaturschwankungen zurückzuführen sein, da Lagerung und Messung bei

unterschiedlichen Temperaturen (7°C und RT) erfolgten. Die nachbehandelte Probe unterlag den gleichen Einflüssen, jedoch sind die Effekte in diesem Fall zu stark, als dass es nur diesen Grund geben kann.

S. Jendzej et al. zeigte bei der Untersuchung von lasergenerierten Platinnanopartikeln, dass monodisperse Partikel einem zweistufigen Wachstumsprozess unterliegen. Die Partikel koagulieren im ersten Schritt schnell aufgrund der Existenz von Subnanometer-Partikeln, auch Cluster genannt, und unterliegen anschließend einem langsamen Wachstum aus Koaleszenz. [189] Dieses Verhalten erklärt auch die beschriebenen Ergebnisse der monomodalen Goldnanopartikel und lässt vermuten, dass sich zusätzlich Nanopartikel < 3 nm in den hergestellten Kolloiden befinden. Hierbei ist anzumerken, dass die Goldkonzentration in dem beobachteten Bereich zwar nicht deutlich ansteigt. Allerdings entspricht der Anstieg um 2 µg/mL nach den ersten zwei Tagen (Anhang: Abbildung 100 A) bereits $1,2 \cdot 10^{13}$ 2 nm Partikeln, welche miteinander oder mit den größeren plasmonenresonanten Partikel koagulieren können.

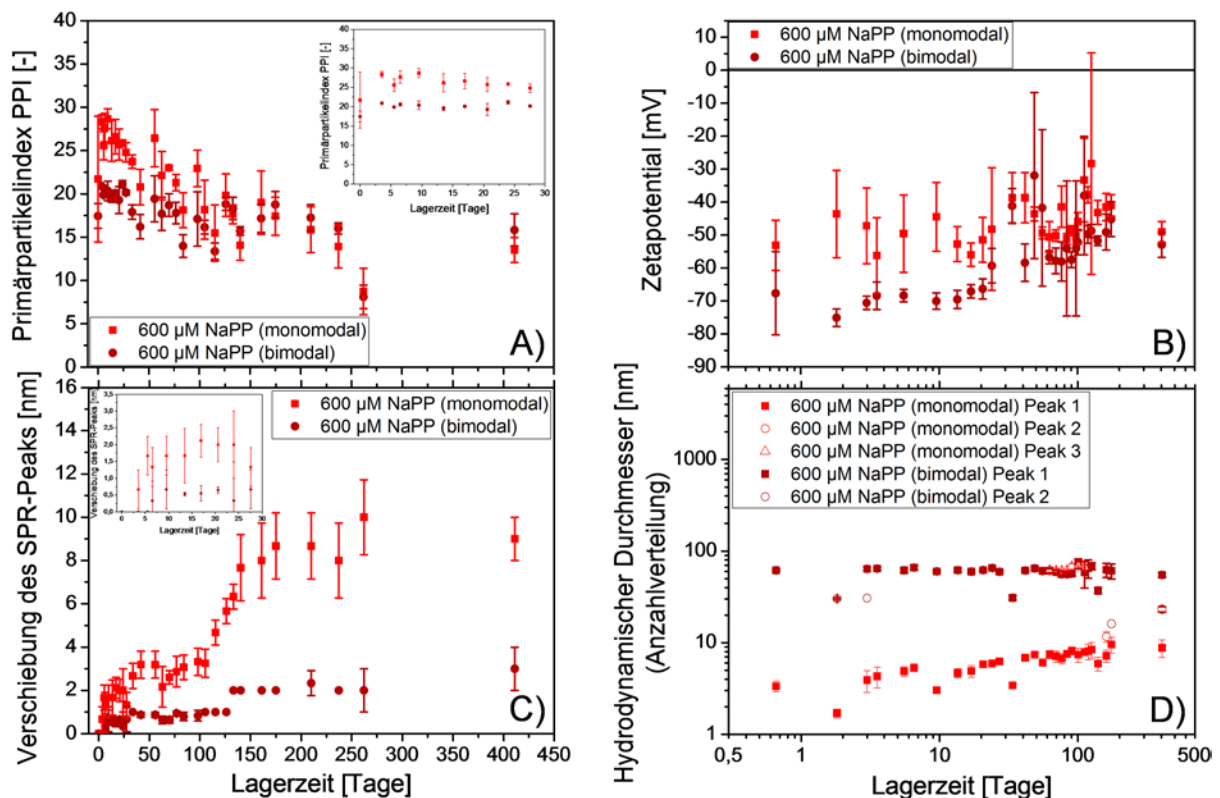


Abbildung 16: Langzeitstabilität der bimodalen und monomodalen Goldnanopartikel, welche in 600 µM Natriumphosphatpuffer hergestellt wurden, über einen Zeitraum von 13,5 Monate: Darstellung des Primärpartikelindex (A), des Zetapotentials (B), der Verschiebung des SPR-Peaks (C) und des hydrodynamischen Partikeldurchmessers aus der Anzahlverteilung (D).

Zusammenfassend wurden verschiedene Abtragsmedien für die Herstellung von Goldkolloiden, welche ein optimales Ausgangsmaterial für eine spätere Biofunktionalisierung sowie den Einsatz in biologischen Tests darstellen sollten, untersucht. Der Einsatz von 600 μM Natriumphosphatpuffer stellt die am besten geeignete Variante dar. Hierbei wird eine Reduktion der Partikelgröße und Partikelgrößenverteilung erreicht. Weiterhin ist bei dieser Variante eine effiziente Trennung zwischen Partikeln kleiner und größer 10 nm vorzufinden, was die Abtrennung der großen Mode (10-100 nm) erleichtert. Für die Abtrennung wurde die Methode der Ultrazentrifugation bevorzugt, da in diesem Fall die Entfernung der Partikel > 10 nm am erfolgreichsten war. Die monomodalen Goldnanopartikel haben eine Größe von $5,2 \pm 1,2$ nm, einen IEP von pH 1,33 und weisen einen Puffereffekt zwischen pH 6,5 und pH 8,4 auf. Die Langzeitstabilität jener Partikel ist auf etwa einen Monat begrenzt, weshalb der Schritt der Ultrazentrifugation unmittelbar vor der Verwendung ideal ist. Der Rohabtrag hingegen kann langfristig bis mindestens zu einem Jahr bei 7°C gelagert werden.¹⁸

¹⁸ Weitere Ergebnisse sind ergänzend in Kapitel 7.8.2. im Anhang zu finden.

4.2. Variation des Ligandentyps: Einfluss verschiedener Faktoren auf die Partikeleigenschaften und Oberflächenbeladung von Goldnanopartikel-Biokonjugaten

In diesem Kapitel wird die Untersuchung der hergestellten monomodalen Goldnanopartikel auf ihre Wechselwirkungen mit verschiedenen Liganden beschrieben. Hierbei wurden sowohl verschiedene Salze (NaCl, NaPP, Na₃Citrat) als auch kleine Moleküle (Liponsäure und Dihydroliponsäure) und Biomoleküle wie Oligonukleotide und Peptide verwendet. Die Biokonjugate wurden auf ihre Stabilität und ausgewählte Proben auf ihre Oberflächenbelegung untersucht. Schließlich erfolgte die Analyse von bifunktionalen Konjugaten.

4.2.1. Einfluss von Salzen und kleinen Molekülen auf Goldnanopartikel



Aus der Literatur ist bereits bekannt, dass die Anwesenheit von Ionen im mikromolaren Konzentrationsbereich bei der Herstellung von Goldnanopartikeln die Reduktion der Partikelgröße zur Folge hat und ferner eine stabilisierende Wirkung zeigt. [73, 85] Im Folgenden soll untersucht werden, ob die nachträgliche Zugabe (*ex situ*) von Salzen auf die mit 600 µM NaPP hergestellten monomodalen und monodispersen Goldnanopartikel eine Verbesserung der Stabilität aufweist. Für diese Experimente sind Trinatriumcitrat (Na₃Citrat), Natriumchlorid und Natriumphosphatpuffer ausgewählt worden. Die zugegebenen Mengen liegen in einem mikromolaren bis millimolaren Konzentrationsbereich. Die Daten werden zum einen in Abhängigkeit der zugegebenen Ladungen und zum anderen in Abhängigkeit des pH-Wertes dargestellt. In beiden Fällen stellt Trinatriumcitrat das Referenzsystem dar. Für die nähere Untersuchung des Einflusses der Ionenstärke wurde NaCl verwendet und für die Analyse eines pH-Effektes wurde NaPP zu dem Kolloid gegeben, um den pH-Wert ohne Änderung der Ionenstärke einzustellen.

Die *Ex-situ*-Zugabe von Natriumchlorid, Natriumphosphatpuffer und Trinatriumcitrat hat einen Einfluss auf die Stabilität der Partikel. Die Zugabe von Natriumchlorid und Trinatriumcitrat führt zu einer kontinuierlichen Zunahme des PPI bis zu einem Maximum bei 6.700 Ladungen pro Nanopartikel. Anschließend erfolgt eine Abnahme

des PPI bis zum Erreichen des Ursprungswerts bei etwa 805.000 Ladungen/AuNP. (Abbildung 17 A) Die Verbesserung der Stabilität liegt für die Zugabe von NaCl bei etwa 13%. Die Zugabe von Trinatriumcitrat hingegen erreicht bei einem Anstieg des PPI von 27,0 auf 37,9 eine Erhöhung der Stabilität um 40%. Der pH-Wert der Probe liegt bei 6,4.

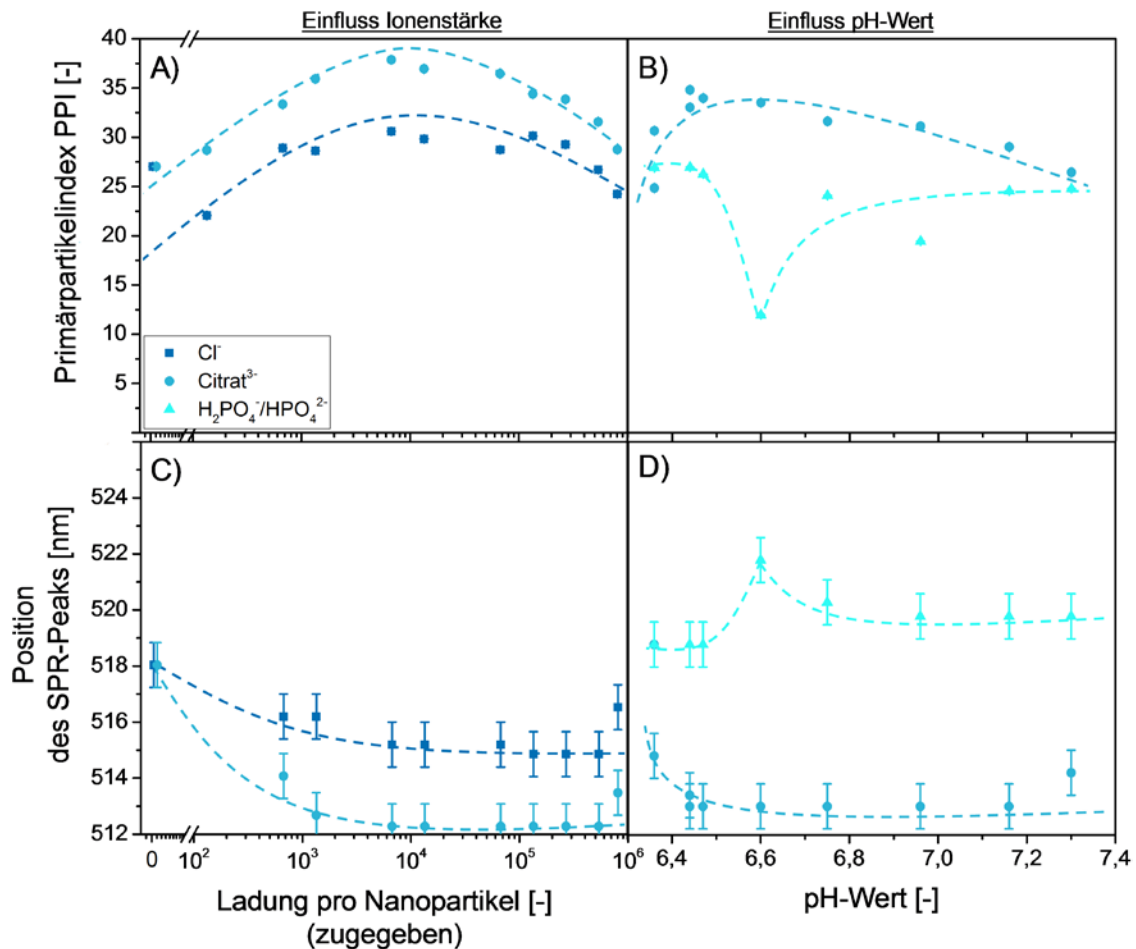


Abbildung 17: Einfluss von Natriumchlorid, Natriumphosphatpuffer und Trinatriumcitrat auf Goldnanopartikel. Darstellung des Primärpartikelindex (A, B) und der Verschiebung des SPR-Peaks in Abhängigkeit der Ladung pro Nanopartikel und des pH-Wertes. Die Ionenstärken der Salze betragen 0 – 54 mM NaCl, 0 – 108 mM Trinatriumcitrat und 8,6 – 17,2 mM NaPP.

Der Natriumphosphatpuffer hat im Gegenteil zu den anderen beiden Salzen keinen verstärkenden Effekt auf die Stabilität. Eine Absenkung der Stabilität um maximal 56% ist zu erkennen. (Abbildung 17 B) Diese Effekte sind auch in der Verschiebung des SPR-Peaks zu sehen. Jedoch tritt für NaCl und Trinatriumcitrat kein Maximum oder Minimum auf, mit steigender Ladung pro Nanopartikel erfolgt eine Blauverschiebung des SPR-Peaks bis zu einer Sättigung bei etwa 1.340 Ladungen pro Nanopartikel. Die maximale Verschiebung der SPR-Peaks liegt für NaCl bei -2 nm und für Trinatriumcitrat bei -6 nm. (Abbildung 17 C) Der Einsatz von Natriumphosphatpuffer führt zu einer Verschiebung des SPR-Peaks um +4 nm bei einem pH-Wert von 6,6.

(Abbildung 17 D) Aus diesen Daten kann geschlussfolgert werden, dass eindeutig eine Wechselwirkung der Nanopartikel mit den anwesenden Anionen in der Lösung auftritt. Hierbei treten anionenspezifische Effekte auf, auf welche im Folgenden nach Darstellung weiterer Ergebnisse dieser experimentellen Reihe näher eingegangen werden soll.

Anhand des stärkeren Anstiegs des PPI nach Zugabe von Citrat-Ionen im Vergleich zu Chlorid-Ionen ist eine bevorzugte Anlagerung der Citrat-Ionen an der Goldoberfläche zu vermuten. Dies kann auch anhand des Zetapotentials (Abbildung 18 A) abgelesen werden. Die Werte für Citrat-konjugierte Partikel unterliegen einigen Schwankungen, sind jedoch hauptsächlich in einem Bereich zwischen -37,6 mV und -43,6 mV zu verzeichnen. Außerdem liegen sie bei allen Proben unterhalb der Werte für Chlorid-behandelte Nanopartikel, wobei die Zetapotential-Werte der beiden Varianten sich bei 270.000 Ladungen/AuNP (-42,6 mV) einander annähern und bei 537.000 Ladungen pro AuNP geringer sind als bei den Partikeln mit Citrat³⁻. Dies lässt vermuten, dass ab dieser Grenze aufgrund der geringeren Größe der Hydrathülle mehr Chlorid-Ionen auf die Nanopartikeloberfläche passen. Der Vergleich zwischen Phosphat- und Citrat-Ionen weist keine Unterschiede auf, was die Vermutung nahelegt, dass dreimal weniger Citrat-Ionen auf der Oberfläche sind als Phosphat-Ionen. (Abbildung 18 B)

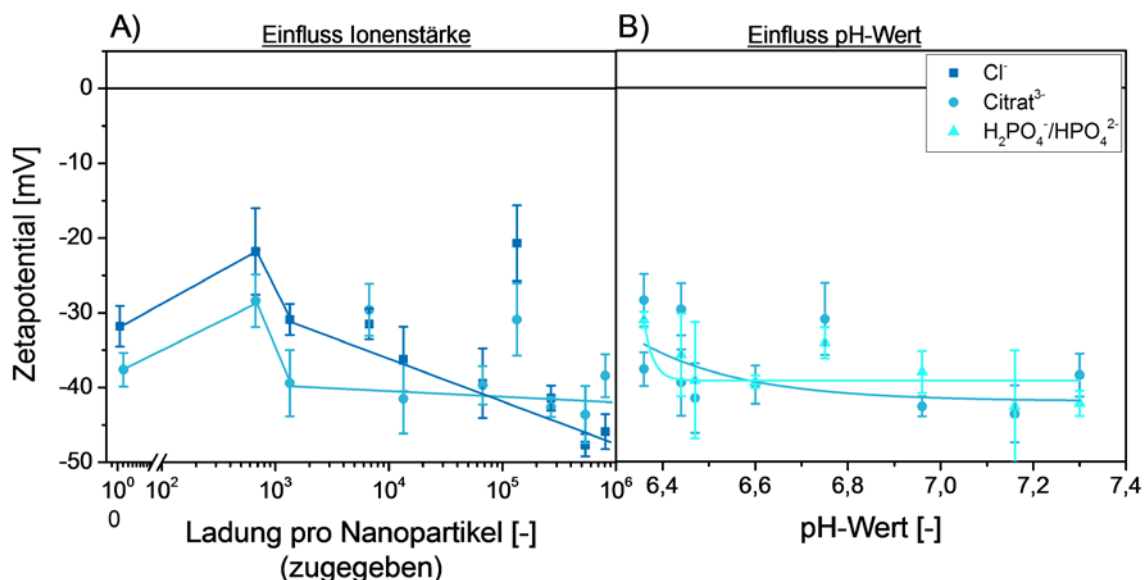


Abbildung 18: Abhängigkeit des Zetapotentials von der Ladung pro Nanopartikel (A) und dem pH-Wert (B) für Natriumchlorid, Natriumphosphatpuffer und Trinatriumcitrat auf Goldnanopartikel. Die Ionenstärken der Salze betragen 0 – 54 mM NaCl, 0 – 108 mM Trinatriumcitrat und 8,6 – 17,2 mM NaPP.

Das unterschiedliche Verhalten der Goldnanopartikel nach Zugabe verschiedener Anionen, welches bezüglich der Stabilität der Rangfolge Citrat³⁻ > Cl⁻ > H₂PO₄⁻/HPO₄²⁻

folgt, kann auf die Polarisierbarkeit und Hydratisierbarkeit der Anionen zurückgeführt werden. Entsprechend der Hofmeister-Reihe, welche eine Einordnung der chaotropen Wirkung von Ionen beschreibt, ist Citrat³⁻ am stärksten hydratisiert und Chlorid am schwächsten. [190] Die Polarisierbarkeit der Ionen folgt der gleichen Reihenfolge.

Die Zugabe von Citrat zu AuNP resultiert jedoch in einer erhöhten Stabilität und einer betragsmäßig höheren SPR-Verschiebung (-6 nm) als bei der Zugabe von Chlorid. Das widerspricht der ursprünglichen Annahme basierend auf der Theorie nach Hofmeister. Demnach müssten sich Citrat³⁻-Anionen, welche mit einem Radius r_H von 0,81 nm [191] fast fünfmal so groß sind wie Chlorid-Anionen ($r_H = 0,168$ nm [192]), aufgrund ihrer starken Hydratisierbarkeit weniger gut an der Partikeloberfläche akkumulieren können. [85] Das Citrat³⁻-Anion besitzt jedoch mit 10 \AA^3 auch eine sehr starke Polarisierbarkeit [191], welche außerdem mehr als doppelt so stark ist wie beim Chlorid-Anion mit $3,7 \text{ \AA}^3$. [193] Demzufolge greift bezüglich der *Ex-situ*-Stabilisierung von Nanopartikeln mit Trinatriumcitrat diese Theorie nicht. Für den Vergleich der Phosphat-Anionen mit den Chlorid-Anionen hingegen kann eine Erklärung darüber erfolgen.

Im Folgenden sollen zunächst die Effekte der Anlagerung von Chlorid- und Phosphat-Anionen diskutiert werden, bevor Erklärungen über die Anlagerung der Citrat³⁻-Anionen an die Goldoberfläche folgen. Hierbei ist anzumerken, dass in vermutlich allen Fällen bei der Anlagerung nach *Ex-situ*-Zugabe weiterer Ladungen ein Austausch mit den nach der Synthese bereits auf den Nanopartikeln befindlichen Phosphat-Anionen auftritt.

Die Konjugation der Goldnanopartikel mit NaCl weist im Vergleich zu NaPP einen grundsätzlich stabilisierenden Effekt auf. Der Grund hierfür liegt an der geringeren Hydratation des Chlorid-Ions [192], wodurch eine spezifische Adsorption der Anionen in der elektrochemischen Doppelschicht der Nanopartikel ermöglicht wird. [85, 95] Aufgrund der Reduktion des Zetapotentials (Abbildung 18 A) im Vergleich zu den unbehandelten Nanopartikeln kann davon ausgegangen werden, dass die Anionen sich vermehrt in der Stern-Schicht der Nanopartikel anlagern. Aufgrund der vermehrten negativen Ladung steigt die elektrostatische Abstoßung der Nanopartikel und sie werden besser stabilisiert. [85] Bei hohen Ladungen wechselt dies jedoch auf eine geringfügig ausgeprägte Reduktion des PPI, was auf eine Reduktion der Debye-Länge und reduzierte Abstoßung zurückgeführt werden kann. [95]

Die Reduktion der Oberflächenladung könnte vorteilhaft bei der Konjugation mit positiv geladenen Liganden wirken, aufgrund der Tatsache, dass zum einen die Anziehung zwischen Ligand und Partikel verstärkt wird und zum anderen der IEP des Systems, der den Ladungsausgleich bestimmt [72], verschoben werden kann.

Die AuNP-H₂PO₄⁻/HPO₄²⁻-Konjugate weisen ähnliche Zetapotential-Werte auf wie die AuNP-Citrat³⁻-Konjugate. Allerdings sind keine weiteren stabilisierenden Effekte vorzufinden. Teilweise besitzen die Konjugate eine geringere Stabilität mit NaPP. Der pH-Bereich dieser Konjugate liegt zwischen pH 6,36 und pH 7,3. Mit dem Wissen, dass der pK_s-Wert von Phosphat bei 7,2 liegt [188], kann somit davon ausgegangen werden, dass vermehrt H₂PO₄⁻-Ionen in dem System vorliegen. Mit der Polarisierbarkeit von 4,5 Å³ [193] und einem Radius des hydratisierten Anions von 0,213 nm [192] ist das H₂PO₄⁻-Anion in der Hofmeister-Reihe im Vergleich zu Cl⁻ ein kosmotropes Anion. [193] In diesem Fall kann zwar aufgrund des reduzierten Zetapotentials von einer Anlagerung der Phosphat-Anionen an die Partikeloberfläche ausgegangen werden, jedoch handelt es sich hierbei um eine schwache Wechselwirkung, welche die Abstoßung der Partikel zueinander nicht erhöht. [85]

Der pH-Wert-abhängige Verlauf des PPI und der SPR-Verschiebung kann auf eine Verschiebung des Gleichgewichts zwischen den HPO₄²⁻-Ionen und den H₂PO₄⁻-Ionen und in Verbindung damit auf eine Verstärkung der Ionenstärke mit steigendem pH-Wert zurückgeführt werden. Bei einem pH-Wert der Probe von 6,36 liegt ein Überschuss an einwertigen Phosphat-Ionen in der Lösung vor und die Gesamt-Ionenstärke (HPO₄²⁻ + H₂PO₄⁻) beträgt 8,6 mM. Bei der Erhöhung des pH-Wertes bis zu 7,3 verschiebt sich die Gesamt-Ionenstärke zu 17,2 mM. (Anhang: Abbildung 101)

In diesem Zusammenhang ist die Debye-Länge, welche bei der Untersuchung von kolloidalen Systemen in elektrolytreichen Lösungen ein wesentlicher Parameter bezüglich der Partikelstabilität ist, zu beachten. [95, 96] Mit steigender Ionenstärke sinkt die Debye-Länge [96], was zu einer geringeren Abstoßung und damit auch zu einer geringeren Stabilität führt. [95] Bei der Verwendung von NaPP scheint die Debye-Länge zumindest teilweise einen Einfluss zu haben.

Anstatt der in diesem Fall zu erwartenden Destabilisierung mit steigendem pH-Wert konnte anhand der Daten jedoch nur ein Einbruch der Stabilität bei pH 6,6 ermittelt werden. Die Ionenstärke beträgt 10,1 mM. Hierbei ist anzumerken, dass sich die

Veränderung des pH-Wertes zwar in einer vernachlässigbar kleinen Größenordnung befindet, die Veränderung der Ionenstärke hingegen einen Bereich von 8,6 mM umfasst. Dies entspricht einer Differenz von $3,8 \cdot 10^4$ Ladungen pro Nanopartikel. Die anfänglich reduzierte Stabilität bei größeren pH-Werten und Ionenstärken kann darauf zurückgeführt werden, dass wieder mehr HPO_4^{2-} -Ionen, welche fast doppelt so stark hydratisiert sind wie H_2PO_4^- -Ionen [194], in der Lösung sind und dadurch die Partikel zunächst destabilisieren. Bei höheren pH-Werten und Ionenstärken kann die folgende Verbesserung der Stabilität aufgrund der höheren Ladung pro Anion und einer verstärkten Abstoßung der Partikel angenommen werden.

Für NaCl und Trinatriumcitrat ist die gleiche Anzahl an Ladungen eingesetzt worden, was dazu führt, dass die Ionenstärke für Trinatriumcitrat doppelt so groß ist wie die von NaCl. Hierbei ist anzumerken, dass sich die Verläufe der Messdaten und die gefundenen Tendenzen auch in Abhängigkeit der Ionenstärke nicht ändern würden. Allerdings muss für die Einordnung der Stabilität bezüglich der Debye-Länge auch die Dielektrizitätskonstante der Elektrolyte in die Betrachtung einbezogen werden. Da dieser Wert jedoch hier nicht vorliegt, muss von einer exakten Berechnung der Debye-Länge abgesehen werden. Zudem tritt keine Destabilisierung des Kolloids, welche in einer schlechteren Qualität des Ausgangszustands resultieren würde, in Form einer Agglomeration auf. Demnach kann davon ausgegangen werden, dass die Debye-Länge ausreichend groß ist. In diesem Fall ist demzufolge der Einfluss der Debye-Länge auf die Stabilität zu vernachlässigen.

Das Trinatriumcitrat stellt bei der *Ex-situ*-Konjugation von Goldnanopartikeln die am besten stabilisierende Substanz dar. Wie bereits erwähnt, ist dies nicht auf eine reine Ionenstabilisierung zurückzuführen. Im Fall des Trinatriumcitrats erfolgt vermutlich ein spezieller Bindungsmechanismus, welcher im Folgenden kurz erläutert werden soll.

Trinatriumcitrat ($\text{Na}_3(\text{CH}_2)_2(\text{COO})_3\text{COH}$) besitzt drei Carboxygruppen und eine Hydroxygruppe, mit denen die Bindung an Goldnanopartikel auf zwei verschiedene Arten erfolgen kann. Hierbei bleibt eine der Carboxygruppen immer unkoordiniert. Die Bindung kann einerseits durch Koordination der zentralen und einer endständigen COO^- -Gruppe an die AuNP-Oberfläche erfolgen. Andererseits ist die zentrale Carboxygruppe an die Oberfläche koordiniert und es erfolgt eine Wechselwirkung der

zentralen OH-Gruppe mit einer der endständigen Carboxygruppen. Es konnte gezeigt werden, dass ein 1:2-Verhältnis der beiden Bindungsarten besteht, wobei die Koordination über zwei COO^- -Gruppen den höheren Anteil aufweist. Diese Anbindung kann durch Erhöhung des pH-Wertes über 11 zu einer weiteren Konformation führen, bei der alle freien COO^- -Gruppen an die Oberfläche der Partikel binden. Die Bindungsstärke der COO^- -Au-Bindung liegt bei 2 kcal/mol. [195]

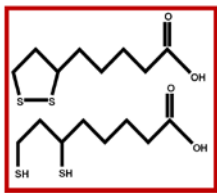
In dem vorliegenden Fall kann nicht bestimmt werden, welche Konformation die Partikel auf der Goldoberfläche einnehmen, da in beiden Fällen negative Ladungen der Carboxygruppen zu der Oberflächenladung der Partikel beitragen. Dies bestätigt auch die hier gefundene Reduktion des Zetapotentials mit steigender Anzahl an Ladungen.

Es ist zudem möglich, dass Trinatriumcitrat in Anwesenheit überschüssiger Liganden Multilagen bildet. In diesem Fall werden Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den freien Citrat³⁻-Anionen und den auf der Partikeloberfläche gebundenen Anionen ausgebildet. Die Bindungsstärke von zwei Wasserstoffbrückenbindungen beträgt 28 kcal/mol und ist demnach wesentlich stärker als die COO^- -Au-Bindung. Hieraus wird deutlich, dass thermodynamisch zunächst die H-Brücken gebildet werden und dann die Wechselwirkung mit der Partikeloberfläche erfolgt. Die verbesserte Stabilität der Goldnanopartikel nach Zugabe von Trinatriumcitrat erfolgt aufgrund der elektrosterischen Stabilisierung durch die Citrat³⁻-Anionen. Die zentralen COO^- - und OH-Gruppen der äußeren Schicht stabilisieren die Partikel. [195]

Aus der vorhergehenden Untersuchung wird ersichtlich, dass lasergenerierte Nanopartikel nachträglich mit Natriumchlorid und Trinatriumcitrat im mikromolaren bis millimolaren Konzentrationsbereich bezüglich ihrer Stabilität verbessert werden können. Natriumphosphatpuffer hingegen stellt keinen guten *Ex-situ*-Stabilisator dar.

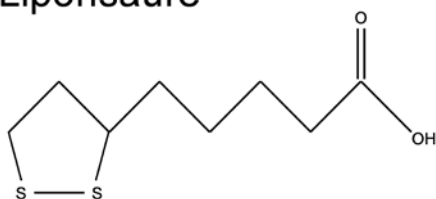
Während bei Natriumchlorid die Stabilisierung durch eine spezifische Anlagerung der Anionen in der Stern-Schicht und der daraus resultierenden stärkeren elektrostatischen Abstoßung erfolgt, tritt bei Trinatriumcitrat eine koordinative Bindung in Verbindung mit einer elektrosterischen Abstoßung auf.¹⁹

¹⁹ Weitere Ergebnisse sind ergänzend in Kapitel 7.8.3. im Anhang zu finden.



In einer etwas höheren, aber dennoch ähnlichen Größenordnung des Molekulargewichts wie Salze liegen kleine Moleküle wie Liponsäure oder Dihydroliponsäure mit einem Molekulargewicht von 206,3 Da und 207,3 Da. Im Folgenden sollen die Wechselwirkungen dieser kleinen Moleküle mit Goldnanopartikeln diskutiert werden und im weiteren Verlauf auf den Unterschied zwischen Disulfiden und Dithiolen bei der Konjugation eingegangen werden. (Abbildung 19)

Liponsäure



Dihydroliponsäure

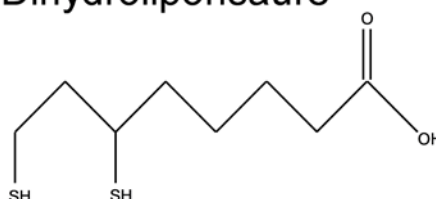


Abbildung 19: Strukturformeln von Liponsäure und Dihydroliponsäure.

Im Vergleich zu den verwendeten Salzen Natriumchlorid und Trinatriumcitrat weisen die Konjugate mit Liponsäure (LS) und Dihydroliponsäure (DHLS) verschiedene Eigenschaften bezüglich der Stabilität auf. Es ist keine Verbesserung der Stabilität, welche mit dem Primärpartikelindex und der Verschiebung des SPR-Peaks ermittelt werden kann, durch Zugabe der Liganden zu erkennen. (Abbildung 20 A und B) Im Gegenteil, es ist eine Reduktion der Stabilität, wie bei der Verwendung von NaPP, zu verzeichnen. Während der Primärpartikelindex für die Konjugate mit Liponsäure bereits bei der Zugabe von 130 Liganden pro Nanopartikel (= 12,5 μM) auf etwa die Hälfte des Anfangswertes von 13 absinkt und dann stabil bleibt, sinkt der PPI für die DHLS-Konjugate mit flacher Steigung und kontinuierlich ab, bis sich die Werte an die der LS-Konjugate annähern. Die Verschiebung des SPR-Peaks beider Konjugatvarianten unterliegt Schwankungen von $\pm 0,7$ nm bis $\pm 1,1$ nm, jedoch sind gleiche Tendenzen wie beim Primärpartikelindex zu erkennen. Bei den AuNP-LS-Konjugaten tritt eine SPR-Verschiebung von maximal 1,3 nm auf und bei den AuNP-DHLS-Konjugaten von bis zu 2,4 nm, was in beiden Fällen auf eine Reduktion der Interpartikelabstände (Agglomeration) und somit eine Plasmonenkopplung zwischen den Partikeln hindeutet. Dies bedeutet jedoch zusammen mit den PPI-Daten keine Destabilisierung im Sinne der Partikelaggregation, also ein Ausfallen der Partikel.

Die Aufreinigung der Konjugate mittels Ultrazentrifugation zur Entfernung ungebundener Liganden gibt Aufschluss über die Anbindung der Liganden und ihre stabilisierende Wirkung. (Abbildung 20 C und D) Zum einen werden durch diesen

Prozess ungebundene Liganden entfernt, welche einen Einfluss haben können insbesondere bei der weiteren Verwendung in biologischen Experimenten. Zum anderen wirken Kräfte von 30.000 x g auf die Nanopartikel, welche nur dann keine Aggregation der Partikel zur Folge haben, wenn sie ausreichend gut stabilisiert vorliegen. In beiden Fällen kann dies, abhängig von der eingesetzten Ligandenmenge pro Partikel, bestätigt werden. Die Referenz ohne Liganden zeigt eine Reduktion des PPI von 22,6 auf 1,2 und einer SPR-Verschiebung von 12 nm, dies ist auf eine Aggregation durch die hohen g-Kräfte zurückzuführen.

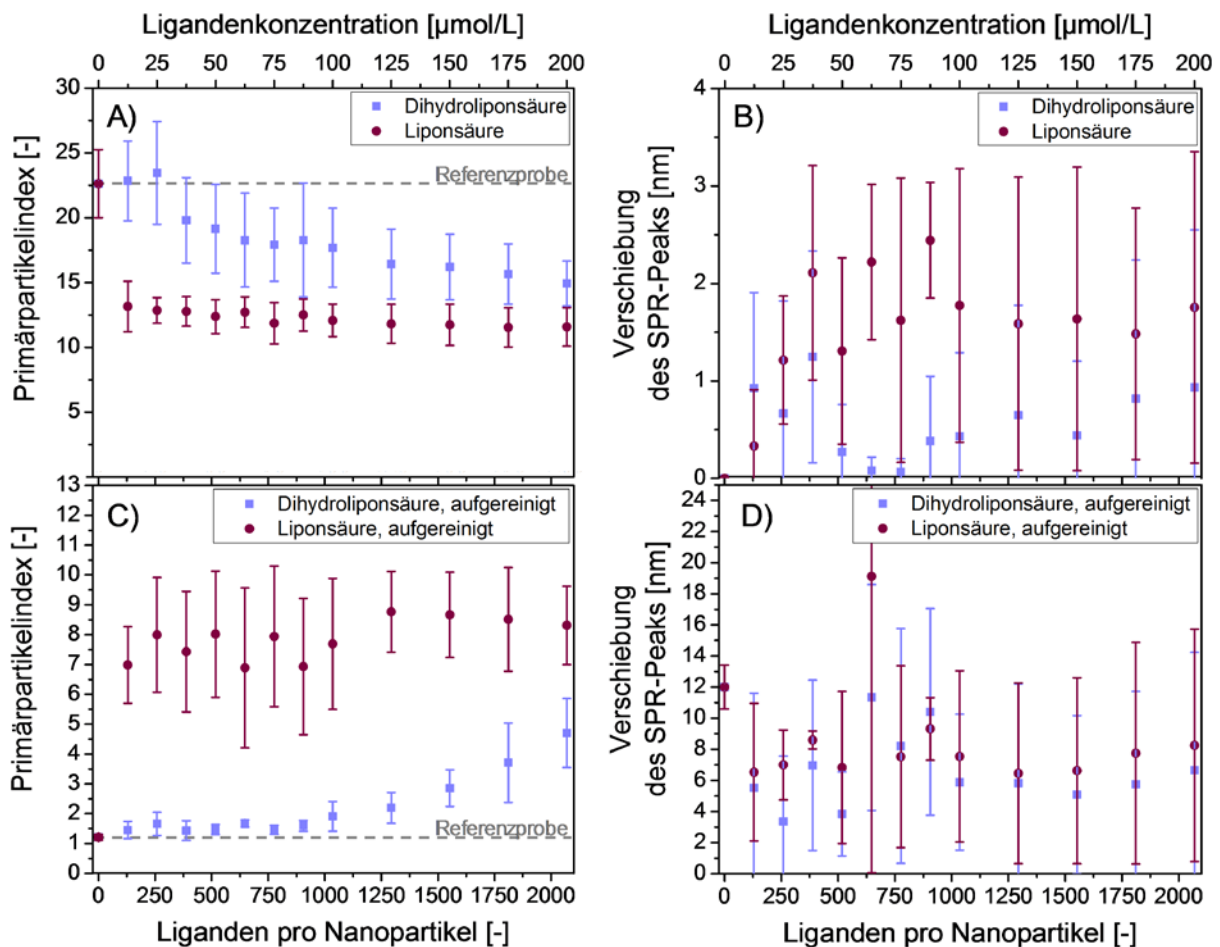


Abbildung 20: Einfluss der Disulfid- und Dithiol-Gruppen auf das Goldnanopartikel-Konjugat. Darstellung des Primärpartikelindex (A, C) und der Verschiebung des SPR-Peaks (B, D) von Liponsäure und Dihydroliponsäure in Abhängigkeit der Anzahl an Liganden pro Nanopartikel nach der Konjugation und nach der Aufreinigung der Konjugate.

Die Funktionalisierung der Liganden mit Liponsäure zeigt bei allen eingesetzten Mengen der Liganden pro Nanopartikel eine geringe Reduktion des PPI von durchschnittlich 12,3 auf 8,0. Demnach wurden die Partikel bei allen Ligandendosen ausreichend während der Ultrazentrifugation stabilisiert, um einer Aggregation vorzubeugen. Dihydroliponsäure stabilisiert die Partikel bei geringen Ligandenkonzentration für diesen Zweck unzureichend, dies ist an dem Absinken der

Werte des Primärpartikelindex, wie bei der Referenzprobe, auf 1,3 zu erkennen. Erst ab 1035 Liganden pro Nanopartikel ist ein Anstieg zu verzeichnen. Jedoch wird selbst bei der höchsten eingesetzten Menge von 2070 Liganden (= 200 μ M) lediglich ein um 68% reduzierter PPI-Wert von 4,7 erreicht.

Die Daten zur Position des SPR-Peaks weisen in beiden Fällen eine weitere Verschiebung auf, jedoch ist hierbei keine Tendenz ersichtlich. Für die AuNP-LS-Konjugate liegt die Verschiebung durchschnittlich bei $7,5 \pm 4,4$ nm und für die AuNP-DHLS-Konjugate bei $8,0 \pm 4,8$ nm. Die in den Ergebnissen des PPI auftretenden Effekte können nicht bestätigt werden. Aufgrund der Schwankungen kann hingegen geschlossen werden, dass eine Überlagerung von zwei auftretenden Effekten erfolgt. Zum einen beeinflussen die gebundenen Liganden den Brechungsindex an der Oberfläche der Partikel und zum anderen tritt ein Agglomerationsverhalten der Partikel auf, welches durch die hohen g-Kräfte bei der Ultrazentrifugation noch verstärkt wird. Dadurch kann kein Trend an der Verschiebung des SPR-Peaks erkannt werden.

Der hydrodynamische Durchmesser wurde nach der Aufreinigung der Partikel gemessen und weist den gleichen Verlauf auf wie die Werte des Primärpartikelindex. (Abbildung 21) Die Referenzprobe hat nach der Aufreinigung eine Größe von $22,5 \pm 8,0$ nm, dies bestätigt die Aggregation nach der Aufreinigung. Die Konjugate mit Liponsäure weisen für alle vermessenen Mengen der eingesetzten Liganden pro Nanopartikel von 518 bis 1800 Liganden pro Nanopartikel eine Größe von $7,5 \pm 1,8$ nm auf. Dies liegt in dem gleichen Größenbereich wie die zur Konjugation verwendeten Nanopartikel. Da Liponsäure selbst nur eine Länge von etwa 1 nm hat, ist kein deutlicher Beitrag zu einem vergrößerten Durchmesser zu verzeichnen. Dies ist der Beweis, dass die Partikel durch die Aufreinigung mittels Ultrazentrifugation nicht agglomerieren und nach dem Redispergieren als einzelne (primärpartikuläre) Konjugate vorliegen.

Die DHLS-Konjugate hingegen bestätigen die Annahme, dass erst bei einer erhöhten Menge an eingesetzten Liganden von mindestens 518 Liganden/AuNP eine Stabilisierung der Partikel auftritt, da bei dieser Ligandendosis ein hydrodynamischer Durchmesser von $80,4 \pm 23,1$ nm vorliegt und dieser mit geringer Steigung auf $28,0 \pm 7,2$ nm bei 2070 Liganden/AuNP absinkt.

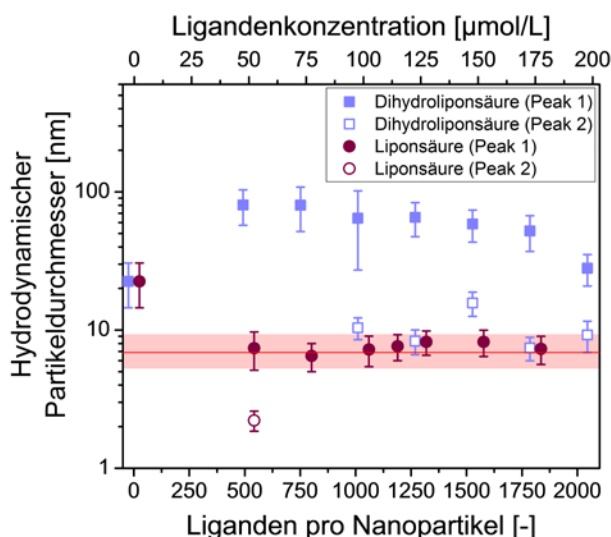


Abbildung 21: Darstellung des hydrodynamischen Partikeldurchmessers (Anzahlverteilung) abhängig von der eingesetzten Anzahl der Liganden pro Nanopartikel von Konjugaten mit Liponsäure und Dihydroliponsäure nach der Aufreinigung mittels Ultrazentrifugation. Der rote Bereich kennzeichnet die Größe der monomodalen Goldnanopartikel, welche zur Konjugation verwendet wurden.

Aufgrund der Tatsache, dass die Struktur der beiden Moleküle bis auf die verschiedenen Endgruppen gleich ist, kann das unterschiedliche Verhalten der LS- und DHLS-Konjugate auf diese Gruppen zurückgeführt werden. Beide Moleküle besitzen zwei Schwefelatome, welche bei der Liponsäure als Disulfid und bei der reduzierten Dihydroliponsäure als Dithiol vorliegen.

Eine mögliche Erklärung für die unterschiedlichen Effekte ist, dass bei den LS-Konjugaten die Liponsäure mit beiden Schwefelatomen an der Goldoberfläche eines Nanopartikels bindet, was zu einer Verringerung der möglichen, an der Oberfläche bindenden Liganden führt. Dies wurde bereits durch Z. Li et al. [196] gezeigt. Weiterhin wurden bereits Arbeiten veröffentlicht, in denen zwei Partikel an einem Schwefel-Atom gebunden sind. Hierbei gibt es jedoch unterschiedliche Ansätze zur Strukturaufklärung, in denen einerseits die Bindung eines zweiten AuNPs zwischen zwei Schwefel-Atomen eines Liganden [14] beschrieben wird. Andererseits besteht die Möglichkeit, dass an nur einem der beiden Schwefel-Atome eines Liganden ein weiterer Goldnanopartikel gebunden wird. [197] Diese Fälle wurden jedoch für Partikel kleiner 3 nm beschrieben und stellen für die vorliegende Partikelgröße von 5 nm die Schwierigkeit der dadurch reduzierten Interpartikelabstände dar. Zudem wurden für die AuNP-LS-Konjugate keine derart starke Agglomeration festgestellt.

Eine andere Erklärung der auftretenden Effekte ist, dass die Liganden die Oberfläche so abschirmen, dass die Partikel ohne Änderungen der Eigenschaften aufgereinigt werden können. Die sofortige Reduktion des PPI, welcher daraufhin anhaltend

gleichbleibt, lässt ein Ablösen der elektrostatischen Stabilisierung durch elektrosterische Stabilisierung vermuten. Durch die Anbindung der LS-Liganden an die Partikel wurde die elektrostatische Stabilisierung der Partikel kurzzeitig gestört und konnte durch die Ligandenstabilisierung nicht wieder vollständig zurückgewonnen werden, was den initial auftretenden PPI-Verlust erklärt. In dem vorliegenden pH-Wert von 8 sind die Carboxygruppen der LS, die einen pKs-Wert von 4,7 [198] besitzt, deprotoniert und tragen somit neben der sterischen Stabilisierung ebenfalls zu der Gesamtstabilität der Konjugate bei.

Die Effekte bei den DHLS-Konjugaten hingegen lassen vermuten, dass bei der Au-S-Bindungsbildung ein anderer Mechanismus als bei der Liponsäure auftritt. Eine Verbrückung der Nanopartikel durch die DHLS-Moleküle kann ausgeschlossen werden, da hierbei ein niedriger Abstand der Partikel zueinander von < 1 nm erforderlich ist. Dies wäre durch eine deutliche Reduktion des PPI nach der Konjugation angezeigt worden. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass die Überbrückung von Nanopartikeln erst ab einem Abstand der beiden Schwefelatome von mehr als vier Kohlenstoffatomen auftritt. [195] Zu diesem Stand kann lediglich eine generelle Wechselwirkung der Liganden mit den Partikeln festgestellt werden, welche auch über die Carboxygruppe der DHLS erfolgen kann und für eine Stabilisierung gegen die g-Kräfte bei der Ultrazentrifugation nicht genügen und erst ab 518 Liganden pro Nanopartikel einen sterischen Effekt erzielen. Dies ist deutlich mehr als eine Monolage.

Die Menge der an der Oberfläche gebundenen Liganden konnte bei diesen Experimenten nicht ermittelt werden, jedoch lässt sich durch die Ermittlung des IEPs (Abbildung 22 A) eine qualitative Aussage darüber treffen. Zum einen besitzen die Konjugate mit jeweils 414 Liganden pro AuNP ($= 40 \mu\text{M}$) bei einem pH-Wert von 6,6 ein negatives Zetapotential von $-54,6 \pm 3,1$ mV (Dihydroliponsäure) und $-45,6 \pm 5,4$ mV (Liponsäure). Das bedeutet, da beide Liganden etwa den gleichen pKs-Wert (LS: 4,7; DHLS: 4,85 [199]) besitzen und demzufolge auch etwa gleich stark deprotoniert vorliegen, dass die Konjugate mit Dihydroliponsäure eine größere Oberflächenbeladung besitzen als die mit Liponsäure. Dies stimmt mit einer Studie von Z. Li et al. überein, bei der die Konjugation von Oligonukleotiden, welche sowohl mit Trithiol als auch mit Disulfid als Ankergruppen ausgestattet sind, durchgeführt wurde. Allerdings kann die bessere Stabilität bei der Verwendung von mehreren

Thiolen, wie es bei DHLS der Fall ist, lediglich für den Zustand der Konjugate vor der Aufreinigung durch Ultrazentrifugation bestätigt werden. [196]

Der isoelektrische Punkt dieser Proben liegt für Liponsäure bei einem pH-Wert von $3,00 \pm 0,02$ und für Dihydroliponsäure bei $1,02 \pm 0,29$. (Abbildung 22 A) Dies bedeutet, dass lediglich die AuNP-DHLS-Konjugate bezüglich ihrer Robustheit gegen Säure im Vergleich zu den ligandenfreien Nanopartikeln ($\text{pH(IEP)}=1,33$) verbessert wurden. Der Unterschied des IEPs der beiden Varianten kann auf die Menge der an der Oberfläche gebundenen Liganden zurückzuführen sein. Der Grund hierfür ist, dass für die Protonierung einer größeren Menge an Liganden, welche eine Carboxygruppe tragen, eine größere Menge Säure erforderlich ist. Dies korreliert mit der Vermutung, dass Dihydroliponsäure lediglich mit einem Schwefelatom oder über die Carboxygruppe auf dem Nanopartikel bindet. Dadurch ist mehr Platz für weitere Liganden.

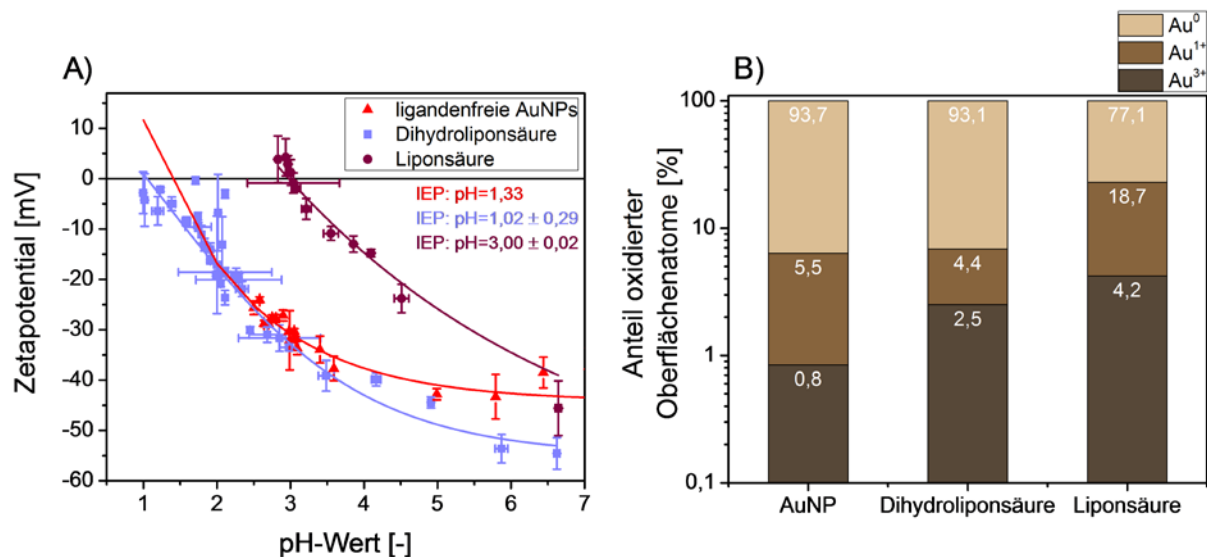


Abbildung 22: Titrationskurve zur Ermittlung des isoelektrischen Punktes anhand des Zetapotential in Abhängigkeit des pH-Wertes (A) und Darstellung des Anteils der Oberflächenatome unterschiedlicher Oxidationszustände von Goldnanopartikeln funktionalisiert mit Liponsäure und Dihydroliponsäure (B).

Röntgenphotoelektronenspektroskopische (XPS) Messungen der konjugierten Goldnanopartikel mit Liponsäure und Dihydroliponsäure zeigen eine Veränderung der Oberflächenoxidation. (Abbildung 22 B) Bei DHLS bleibt die Menge an nicht oxidierten Au-Atomen auf der Partikeloberfläche gleich, es verschiebt sich lediglich die Menge an einfach und dreifach oxidierten Goldatomen, wobei nun 2,5% Au³⁺ und 4,4% Au¹⁺ vorliegen. Bei LS hingegen ist die Nanopartikeloberfläche mit 4,2% Au³⁺ und 18,7% Au¹⁺ stärker oxidiert.

Aus den vorangegangenen Ergebnissen zu der Oberflächenoxidation der Goldatome und der IEP-Bestimmung vor und nach der Konjugation der Goldnanopartikel mit Liponsäure und Dihydroliponsäure wird bestätigt, dass die beiden Liganden einen unterschiedlichen Bindungsmechanismus aufweisen.

Für die Verwendung von Liponsäure ist zu erkennen, dass selbst bei geringer Ligandendosis ein Effekt auf die optischen Eigenschaften (PPI, SPR-Peak) der Partikel erzielt wird. In Verbindung mit dem ermittelten isoelektrischen Punkt des Konjugats, welcher höher liegt als der von ligandenfreien Goldnanopartikeln, kann geschlussfolgert werden, dass die Liponsäure-Moleküle auf der Partikeloberfläche binden. Anhand der XPS-Daten kann diese Bindung auf eine Redox-Reaktion zurückgeführt werden, bei der die Au^0 -Spezies das Edukt darstellt und sowohl Au^{1+} -, als auch Au^{3+} -Spezies entstehen. Dies stimmt mit einer anderen Studie überein, bei der S. Petersen et al. bereits 2009 [15] die These aufgestellt hat, dass die Thiol-Bindung auch vermehrt an den nichtoxidierten Goldatomen lasergenerierter AuNP stattfindet.

Die Dihydroliponsäure hat im Gegenteil erst bei hohen Ligandenkonzentrationen einen Effekt auf die optischen Eigenschaften gezeigt und konnte auch erst in diesem Fall stabilisierend auf die Nanopartikel wirken. Dies weist auf einen anderen Mechanismus hin, welcher zu einer schwächeren Au-S-Bindung führt oder eine Anbindung über die Carboxygruppe beweist. Der IEP der Konjugate liegt bei $\text{pH } 1,0 \pm 0,3$, was mit dem IEP der ligandenfreien Nanopartikel zu vergleichen ist. Dies deutet darauf hin, dass die Dihydroliponsäure-Liganden keine Änderung der Oberflächenladung der Partikel bewirken. In Anbetracht der gleichen Endgruppen beider Liganden kann hieraus angenommen werden, dass bei dem Einsatz von Dihydroliponsäure entweder keine Reaktion erfolgt oder die COO^- -Gruppen auf der Partikeloberfläche koordiniert vorliegen.

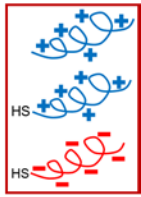
In Bezug auf die Dithiol-Gruppe kann bei der Anbindung auf die AuNP keine Redoxreaktion wie bei der Liponsäure stattfinden. Dies steht jedoch im Widerspruch zu den XPS-Ergebnissen. Hieraus geht hervor, dass eine Wechselwirkung mit der Oberfläche erfolgt, welche sowohl an Au^0 - als auch an Au^{1+} -Spezies zu finden sind. Dies geht einher mit einem erhöhten Anteil an dreifach oxidierten Goldatomen. Allerdings bleibt der Anteil der gesamten oxidierten Oberflächenatome mit 6,9% nahezu unverändert, was die Lage des IEP bestätigt.

Hieraus kann nun geschlossen werden, dass eine Disulfid-Gruppe zu einer stärkeren und besser stabilisierenden Au-S-Bindung führt. Dithiol-Gruppen treten zwar in Wechselwirkung mit der Goldoberfläche, haben aber eine scheinbar geringere Affinität zur Partikeloberfläche und dadurch wesentlich schlechter stabilisierte Konjugate zur Folge.

Zusammenfassend gilt, dass Salze und kleine Moleküle (~200 Da) verschiedene Einflüsse auf Goldnanopartikel haben. Es ist möglich, lasergenerierte Nanopartikel nachträglich mittels Natriumchlorid und Trinatriumcitrat im mikromolaren bis millimolaren Konzentrationsbereich noch stärker zu stabilisieren. Bei der Verwendung kleiner Moleküle ist es wichtig, den Einfluss der, an die Nanopartikel bindenden, Endgruppe zu berücksichtigen. Im Allgemeinen zeigen Konjugate aus Disulfid-Liganden, wie beispielsweise Liponsäure, bessere Eigenschaften bezüglich ihrer Stabilität. Schließlich konnte anhand von Dithiol-Liganden verifiziert werden, dass unterschiedliche Endgruppen des Schwefelatoms zu verschiedenen Reaktionsmechanismen bei der Ausbildung einer Thiol-Bindung führen und sowohl oxidierte als auch nicht oxidierte Goldatome an der Reaktion teilnehmen.²⁰

²⁰ Weitere Ergebnisse sind ergänzend in Kapitel 7.8.3. im Anhang zu finden.

4.2.2. Einfluss von Peptiden auf Goldnanopartikel-Konjugate



In dem folgenden Kapitel wird die Funktionalisierung von Goldnanopartikeln mit verschiedenen Peptiden thematisiert und unter verschiedenen Aspekten untersucht. Zum einen wird der Einfluss eines NLS-Peptids mit (NLS_{Cys}) und ohne Cystein (NLS), welches zur Ausbildung einer kovalenten Bindung eingesetzt wird, auf die Konjugate untersucht. Weiterhin sind Peptide verschiedener Ladung und Hydrophobizität für die Konjugate eingesetzt worden und diese miteinander betreffend Stabilität und Agglomerationsverhalten verglichen worden.

Vergleich NLS mit und ohne Cystein

Für die Untersuchung eines Unterschieds zwischen kovalent gebundenen Peptiden und Peptiden, welche durch elektrostatische Wechselwirkungen gebunden werden, ist das NLS-Peptid ausgewählt worden. Es ist insgesamt nur dreifach positiv geladen und geeignet für die Herstellung von Goldnanopartikel-Agglomeraten. [72]

Der Einfluss der Peptide wird anhand des Primärpartikelindex und der Verschiebung des SPR-Peaks untersucht. (Abbildung 23 A und C) Die Daten wurden auf den Wert des Ausgangsmaterials normiert, um die Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu verbessern. Die Primärpartikelindices der beiden Konjugate sinken nach Zugabe von etwa drei Liganden pro Nanopartikel auf 40,8% und 55,5% des Ausgangswertes ab. Sie verringern sich weiter bis auf 8,7% und 12,4% bei 15,5 und 17,8 der eingesetzten Liganden pro Nanopartikel. In diesem Bereich sind die PPI-Werte der Konjugate mit Cystein niedriger als die der Konjugate ohne Cystein. Bei höheren eingesetzten Ligandendosen ist für beide Varianten ein gleichbleibender Wert von etwa 0,2 festzustellen. Bei der Verschiebung des SPR-Peak sind größere Schwankungen der Werte zu erkennen, jedoch ist die Tendenz vergleichbar. Die maximale Verschiebung des Peaks tritt bei 15,5 und 17,8 der eingesetzten Liganden/AuNP mit etwa 60 nm auf. Die Verschiebung nimmt für die Proben mit NLS_{Cys} kontinuierlich ab, was mit einer Verbesserung der Stabilität einhergeht, während die Proben mit NLS bei etwa 51 nm stagnieren. Eine Verbesserung der Stabilität der NLS_{Cys}-Konjugate tritt jedoch nicht reproduzierbar auf, da die statistischen Fehler bei bis zu 60% liegen.

Nach der Aufreinigung der Konjugate mittels Ultrazentrifugation kann festgestellt werden, dass die Konjugate signifikante Verluste ihrer Stabilität aufweisen. Dies ist anhand der reduzierten PPI-Werte und erhöhten SPR-Verschiebung zu erkennen. (Abbildung 23 B und D) Außerdem zu sehen, dass die Konjugate, bei denen NLS_{Cys} verwendet wurde, bei allen eingesetzten Ligandendosen eine höhere Stabilität aufweisen als die Konjugate mit dem NLS-Peptid ohne Cystein. Dies ist insbesondere an der SPR-Verschiebung zu erkennen, da an dieser Stelle ein Wert von maximal 148 nm für die Verwendung des NLS und von maximal 46,7 nm des NLS_{Cys} vorliegt. Dieser Unterschied zeigt, dass die Verwendung von Liganden mit thiolisierten Endgruppen von Vorteil in Bezug auf die Stabilität ist, insbesondere in Verbindung mit Aufreinigungsmethoden wie der Ultrazentrifugation.

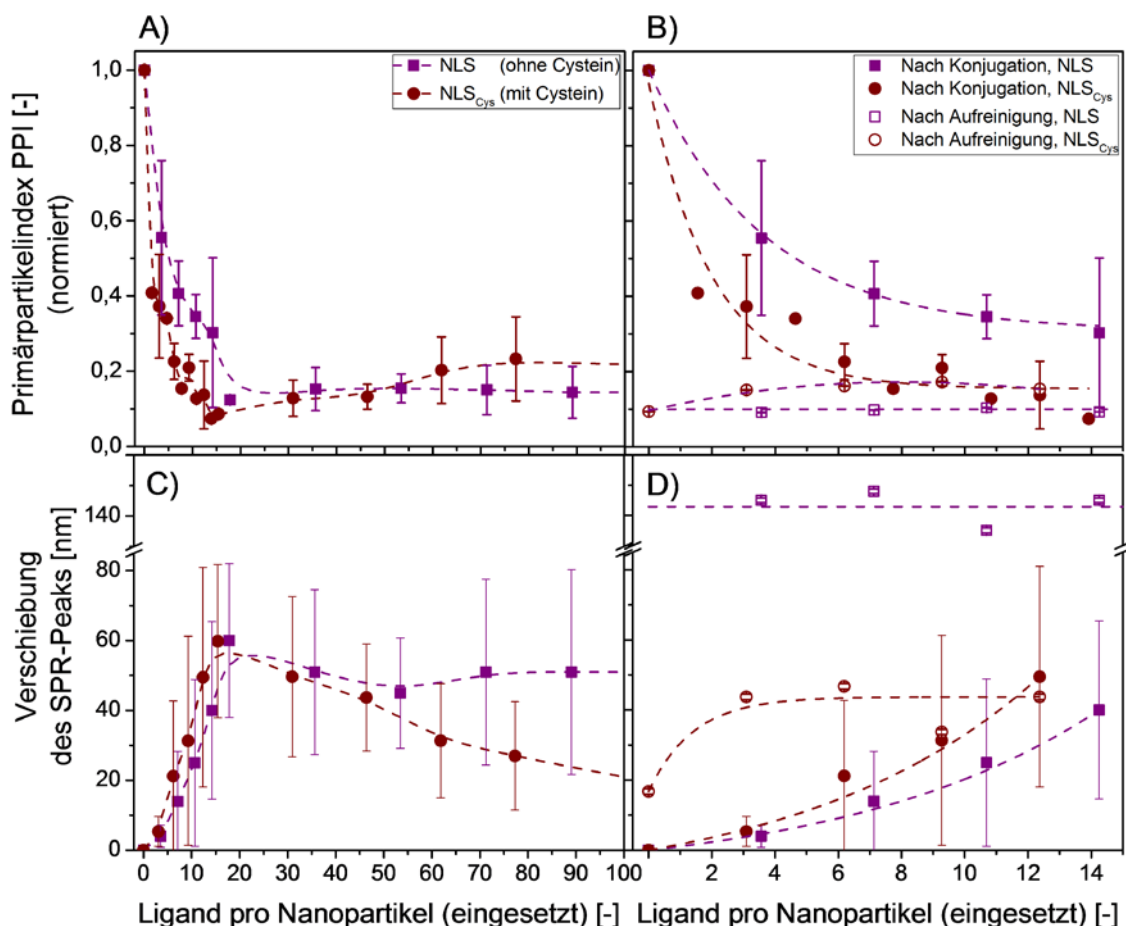


Abbildung 23: Stabilität von AuNP-NLS-Konjugaten unter Verwendung des Peptids mit und ohne thiolbindender Cystein-Endgruppe. Normierter Primärpartikelindex (A, B) und Verschiebung des SPR-Peaks (C, D) der Konjugate in Abhängigkeit der eingesetzten Anzahl an Liganden pro Goldnanopartikel nach der Konjugation (A, C) in einem Bereich der Ligandendosis bis zu 90 Liganden/NP. Ein Vergleich der Proben nach der Konjugation und nach der Aufreinigung ist in einem kleineren Bereich der Ligandendosis bis zu 14 Liganden/NP dargestellt (B, D).

Die verbesserte Stabilität der Konjugate, welche mit dem thiolisierten NLS_{Cys}-Peptid hergestellt wurden und sowohl bei höheren Konzentrationen als auch nach der Aufreinigung zu erkennen ist, kann auf die stärkere Bindung des Liganden zur

Partikeloberfläche, auf die Ausrichtung des Liganden [200] und eine erhöhte Oberflächenbelegung [15] zurückgeführt werden. In diesem Fall richten sich die Liganden mit steigender Menge der eingesetzten Liganden pro Nanopartikel auf und die Bindung bleibt spezifisch am Schwefelatom bestehen. Ohne Thiol-Gruppe binden die Liganden unspezifisch aufgrund ihrer entgegengesetzten Ladung, dies würde geometrisch der Peptidbindung auf Goldnanopartikeln bei geringer Beladung entsprechen. [17] Ein Aufrichten der Liganden ist aufgrund der Tatsache, dass die Bindungsfläche verringert und die Bindung selbst geschwächt werden würde, unwahrscheinlich. Schlussfolgernd gilt hierbei, dass bei monofunktionalen Peptid-Konjugaten eine Thiol-Gruppe erforderlich ist. Im Hinblick auf spätere Anwendungen hingegen, wo beispielsweise spezielle Moleküle in Zellen geschleust werden sollen, kann eine unspezifische Bindung basierend auf elektrostatischen Wechselwirkungen sinnvoll sein.

Vergleich von Peptiden verschiedener Sequenz, Ladung und Länge

Verschiedene Eigenschaften der Peptide, wie beispielsweise ihre Netto-Ladung, haben bei der Kombination mit Goldnanopartikeln einen Einfluss auf die daraus resultierenden Konjugate. Im Folgenden sollen Konjugate aus vier verschiedenen Peptiden untersucht werden. Die Unterschiede liegen in der Sequenz, Ladung und Anzahl an Aminosäuren. Ausgewählt wurden drei zellpenetrierende Peptide, ein NLS_{Cys}-Peptid (CWG₃PK₃RKVED), ein SA-Peptid (CG₂W(VEP₃)₃) und ein Deca-Arginin (CWR₁₀), wobei das erste mit 14 Aminosäuren eine Ladung von +3 trägt, das zweite mit 19 Aminosäuren eine Ladung von -3 und das dritte mit 12 Aminosäuren eine Ladung von +10. Das vierte verwendete Peptid ist ein hydrophobes Peptid (CWKLPMV) aus 7 Aminosäuren mit einer Nettoladung von +1.

Es fällt auf, dass unter Verwendung des negativ geladenen SAP der Primärpartikelindex der Konjugate über den gesamten Bereich der eingesetzten Menge an Liganden nur um 20-30% sinkt. (Abbildung 24 A) Bei wenigen (< 257) Peptidliganden pro Nanopartikel sind die Werte stabil und ab dieser Ligandendosis sinkt der PPI geringfügig. Im Vergleich dazu weisen die Konjugate mit den anderen drei Peptiden ein signifikantes Absinken des PPI mit zunehmender Anzahl eingesetzter Liganden auf. Dieses Absinken ist flacher, je niedriger die Nettoladung des Peptids ist.

Bei den AuNP-CWKLPVM-Konjugaten, welche mit dem hydrophoben Peptid hergestellt worden sind, sinkt der PPI deutlich von 0,93 bei 2,4 Liganden pro AuNP auf 0,07 bei 47,4 Liganden pro AuNP. Anschließend erfolgt ein steiler Anstieg bis zu einem normierten PPI von 0,7 (142,3 Liganden/AuNP). Bei den Konjugaten mit CWR₁₀ und NLS_{Cys} ist das erste Absinken steiler und sinkt auf 0,41 (NLS_{Cys}) und 0,36 (CWR₁₀). Anschließend wird der Verlauf ebenfalls flacher bis die Werte in Gegenwart von etwa 15 Liganden pro NP ein Minimum bei 0,02 und 0,07 erreichen. Hier steigt der PPI wieder an, jedoch erfolgt dies auch weniger ausgeprägt als bei CWKLPVM. Die Konjugate mit CWR₁₀ weisen bei allen Konzentrationen niedrigere Werte auf.

Der SPR-Peak (Abbildung 24 B) weist eine verstärkte Verschiebung in dem Bereich auf, welcher bei einer äquivalenten Ligandendosis liegt, in dem auch der PPI geringer wird. Hierbei ist anzumerken, dass die Konjugate mit dem Peptid CWKLPVM, welches die geringste positive Nettoladung trägt, die stärkste Verschiebung aufweisen. Der Bereich, in dem die Verschiebung auftritt, ist der isoelektrische Punkt (IEP) des Systems und befindet sich im Vergleich zu den anderen Peptiden bei höheren Ligandendosen. Das am stärksten positiv geladene Peptid CWR₁₀ hingegen weist die geringste SPR-Verschiebung auf. Hier befindet sich der IEP des Systems bei geringeren Ligandendosen.

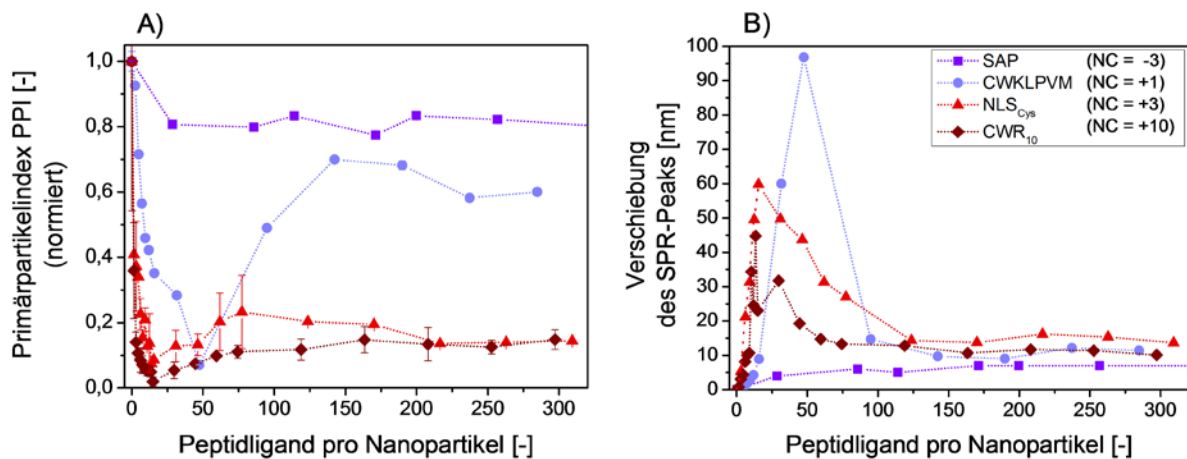


Abbildung 24: Darstellung des normierten Primärpartikelindex (A) und der Verschiebung des SPR-Peaks (B) von Konjugaten mit verschiedenen Peptiden in Abhängigkeit der eingesetzten Anzahl an Liganden pro Nanopartikel.

Bei der Ermittlung des hydrodynamischen Durchmessers der Konjugate (Abbildung 25 A) wurde ein der SPR-Verschiebung ähnliches Verhalten festgestellt. Bei der Verwendung des NLS_{Cys}-Peptids wurden größere Agglomerate von bis zu $31,5 \pm 12,9$ nm (Anzahlverteilung) im Vergleich zu $18,7 \pm 15,9$ nm der CWR₁₀-Konjugate ermittelt. Der nahezu kaum veränderte Durchmesser der AuNP-CWKLPVM-Konjugate

von maximal $9,5 \pm 7,5$ nm kann nicht interpretiert werden, da dies durch kein Ergebnis der anderen Messmethoden bestätigt wird.

Anhand von Zetapotential-Messungen (Abbildung 25 B) kann der Bereich um den isoelektrischen Punkt der Konjugate in Abhängigkeit der Beladung bestimmt werden. Dies ist nicht der Fall bei der Verwendung von negativ geladenen Peptiden, wie dies die Experimente mit SAP zeigen. Hierbei liegen die Daten im negativen Bereich und bleiben dort konstant bei etwa $-23,8 \pm 6,9$ mV. Der IEP der Konjugate mit positiven Peptiden liegt bei 23,1 Liganden pro Nanopartikel für AuNP-CWR₁₀, bei 24,3 Liganden pro Nanopartikel für AuNP-NLS_{Cys} und bei 79,5 Liganden pro NP für AuNP-CWKLPVM. Dies entspricht der Erwartung, dass der IEP von Peptid-AuNP-Konjugaten sich mit steigender Nettoladung zu geringeren Ligandendosen verschiebt. In Bezug auf die Theorie (Kapitel 3.4; Abbildung 10) müsste sich der Bereich ebenfalls verkleinern, was in diesem Fall jedoch nicht zu erkennen ist.

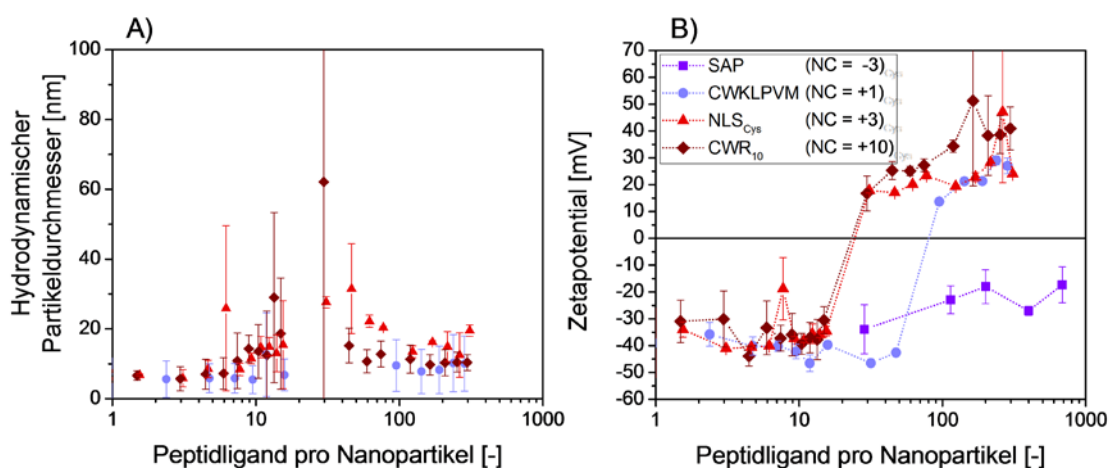


Abbildung 25: Darstellung des Hydrodynamischen Partikeldurchmessers (A) und des Zetapotentials (B) von Konjugaten mit verschiedenen Peptiden in Abhängigkeit der eingesetzten Anzahl an Liganden pro Nanopartikel.

Die Experimente wurden in der Literatur mit bimodalen Goldnanopartikeln durchgeführt [72], während die hierbei verwendeten Partikel monomodal sind. Das Agglomerationsverhalten von monomodalen Nanopartikeln unterscheidet sich von dem der bimodalen Nanopartikel. Dies ist daran zu erkennen, dass bei der Peptidkonjugation auf bimodale Goldnanopartikel der IEP bei 132 Liganden/NP (167 pmol/cm²) für das CWR₁₀-Peptid und bei 624 Liganden/NP (790 pmol/cm²) für das NLS_{Cys}-Peptid auftritt. [72] Dieser Unterschied kann auf die Oberflächenladung der größeren Partikel in einem bimodalen Kolloid zurückgeführt werden. Es ist anzunehmen, dass bei der Zugabe der Peptidliganden unter der Annahme einer statistisch gleichmäßigen Verteilung auf den Nanopartikeln die kleineren Partikel

zunächst ausfallen. Dies liegt daran, dass ihre Oberfläche kleiner ist und dadurch der Ladungsausgleich schneller erfolgt. Erst nach Zugabe einer erhöhten Menge an Liganden erfolgt auch der Ladungsausgleich der größeren Partikel und diese agglomerieren ebenfalls.

Die verstärkte Agglomeration, welche bei den Konjugaten mit CWKLPVM im Vergleich zu denen mit CWR₁₀ oder NLS_{Cys} gefunden wurde, ebenso wie die Verschiebung des IEP in Abhängigkeit der Ligandendosis, war zu erwarten. Der Grund dafür ist, dass im Zuge des Ladungsausgleichs zwischen Peptid und Nanopartikel eine geringere positive Nettoladung des Peptids zu einem ausgeprägten Bereich der Agglomeration um den isoelektrischen Punkt des Konjugats führt. [72] Ist die Nettoladung des Peptids gering, so ist eine sterisch anspruchsvolle Struktur des Peptids erforderlich, um diesen Effekt auszugleichen, sodass die Agglomerate stabilisiert werden. Weiterhin kann dieser Effekt durch den Einsatz einer großen Menge an Liganden erfolgen, um somit eine sterische Stabilisierung zu erreichen. Dieser Effekt ist anhand des PPI der drei verwendeten positiv geladenen Peptide oberhalb von 15 (NLS_{Cys} und CWR₁₀) und 47 (CWKLPVM) Liganden pro Nanopartikel zu erkennen. Die sterische Stabilisierung der monomodalen Nanopartikel oberhalb des IEP (Abbildung 24 A) weist jedoch einen PPI-Wert von nur 20% des Ausgangswertes auf, während bei bimodal verteilten Nanopartikeln etwa 50% erreicht werden. [72] Der Grund hierfür kann in der erhöhten Anzahl an Partikeln bei monomodal verteilten Kolloiden und damit einer insgesamt größeren Oberfläche liegen. Eine sterische Stabilisierung wird somit erschwert.

Im Vergleich des PPI der Konjugate mit NLS_{Cys} und CWR₁₀ ist ein, der in 2014 aufgestellten Theorie [72], gegenläufiger Effekt aufgetreten. Die AuNP-NLS_{Cys}-Konjugate müssten demzufolge weniger stabil sein als die AuNP-CWR₁₀-Konjugate. Der PPI der AuNP-NLS_{Cys}-Konjugate ist jedoch um durchschnittlich $6,0 \pm 3,9\%$ größer als der PPI der AuNP-CWR₁₀-Konjugate. In Anbetracht der Fehlertoleranz und verstärkten Schwankungen der NLS_{Cys}-Konjugate sollten hierbei die Unterschiede nicht für signifikant eingestuft werden, da auch bei der Messung des Zetapotentials (Abbildung 25 B) keine Unterschiede zu erkennen sind. In Verbindung mit der auftretenden Verschiebung des IEP bei den Konjugaten mit CWKLPVM, welches eine Nettoladung von nur +1 besitzt, kann zudem geschlussfolgert werden, dass sich die Schwelle der Nettoladung des Liganden unter Verwendung monomodaler, monodisperser Partikel zu kleineren Werten verschiebt. Das liegt an der höheren Anzahl an Nanopartikeln und der Abwesenheit der größeren Partikel.

Zusammenfassend geht aus diesen Experimenten hervor, dass die Verwendung von thiolisierten Endgruppen bei der Biokonjugation, insbesondere wenn eine Aufreinigung oder Weiterverwendung der Konjugate erfolgt, von Vorteil ist. Die Thiolbindung bietet neben einer erhöhten Stabilität beim Aufreinigungsprozess den Vorteil für biologische Anwendungen, dass die Liganden an den Partikeln kovalent gebunden sind und somit ein kontrollierter Verlauf der Experimente ermöglicht wird, ohne dass die Liganden frei in der Zelle vorliegen.

Der Vergleich der Peptide unterstreicht die Wichtigkeit der Ladung der Peptide und auch deren struktureller Aufbau hinsichtlich der Eigenschaften der hieraus resultierenden Konjugate. Der Vergleich mit früheren Experimenten, in denen bimodale Nanopartikel verwendet wurden, weist auf einen Unterschied in der Konjugatbeschaffenheit hin, wie beispielsweise der Lage des isoelektrischen Punktes der Konjugate. Dies verdeutlicht die Wichtigkeit von reproduzierbaren Ausgangsprodukten und zeigt, dass die Größenverteilung der Partikel einen unbedingt zu beachtenden Punkt in der Analyse der Partikel-Ligand-Wechselwirkung darstellt.²¹

²¹ Weitere Ergebnisse sind ergänzend in Kapitel 7.8.4. im Anhang zu finden.

4.2.3. Methoden zur Aufreinigung und Bestimmung der Oberflächenbeladung von Biokonjugaten

Es gibt verschiedene Methoden, welche bereits standardmäßig zur Aufreinigung von Biokonjugaten eingesetzt werden. Diese Methoden, wie Gel-Elektrophorese (GE) [200, 201], Zentrifugalfiltration [202, 203] oder Ultrazentrifugation [10, 17, 77, 165], haben ihre Basis in der Biotechnologie. Sie trennen Substanzen bezüglich der Unterschiede zwischen den in einer Probe befindlichen Spezies wie Ladung und Größe (GE) oder Gewicht (Zentrifugation). In diesem Kapitel wurden die drei genannten Methoden im Hinblick auf ihre Reinigungsfähigkeit von Goldnanopartikel-Konjugaten getestet und analysiert.

Die Methode der Gel-Elektrophorese wurde zur Aufreinigung von Konjugaten bestehend aus positiv geladenen (NLS_{Cys}, CWR₁₂) und negativ geladenen (SAP, CE₁₂W) Peptiden unterschiedlicher Konzentrationen durchgeführt. Im Folgenden soll nur kurz auf die Erkenntnis dieser Experimente eingegangen werden. Vorteilhaft an der Verwendung der Gel-Elektrophorese auf Basis von Agarose-Gel ist die einfache Handhabung. (Kapitel 7.1.1.2) Es bleiben nach der Aufreinigung keine, oder nur geringe Mengen der Agarose in der Probe zurück und die Methode gibt Aufschluss über die Verteilung der Liganden auf den Partikeln. Die Voraussetzung ist, dass keine polydispersen Partikel verwendet werden. Weiterhin können Rückschlüsse auf die Stabilisierungsfähigkeiten der Liganden gezogen werden. Dies bezieht sich einerseits auf die Ligandenstruktur und Konformation [204], andererseits auf die Ligandenkonzentration. Eingeschränkt sind auch Aussagen über die Größe der Partikel möglich. [201, 205]

Nachteilig an dieser Methode hingegen ist, dass Konjugate mit starken Agglomerationstendenzen, wie es bei der Verwendung von positiv geladenen Peptiden der Fall ist, nur schwer im Gel laufen und dadurch breite Banden entstehen. Auch geringe Ligandenkonzentrationen führen zu der Ausbildung von breiten Banden im Gel, was auf eine ungleichmäßige Verteilung der Liganden auf den Partikeln zurückgeführt werden kann. Dies führt dazu, dass das weitere Vorgehen zur Aufreinigung erschwert wird. Ligandenfreie Partikel, welche im Hinblick auf ihre Größe separiert werden sollen, müssen zuvor stabilisiert werden, da sie andernfalls im Gel agglomerieren würden. Darüber hinaus sind sehr hohe Partikelkonzentrationen von etwa 200 µg/mL notwendig, um die Nanopartikel im Gel sehen zu können. Der

Massenverlust an Nanopartikeln in diesem Verfahren beträgt mindestens 40%. Die Ergebnisse zu diesen Experimenten können dem Anhang (Abbildung 116 - 122) entnommen werden.

Zusammenfassend gilt, dass die Gelelektrophorese für definierte Konjugatsysteme, welche eine sehr hohe Stabilität aufweisen und nicht als Agglomerat vorliegen, ein mögliches Verfahren zur Aufreinigung darstellt. Hierbei ist mindestens eine Monolage negativ geladener Liganden zu einzusetzen. Auch dient diese Methode zur Untersuchung der Ligandenverteilung auf den Nanopartikeln, wobei hierbei ein monomodales und monodisperses Ausgangskolloid zwingend erforderlich ist.

Die anderen beiden Methoden, welche ebenfalls zur Proteinaufreinigung und Separation verwendet wurden, sind die Zentrifugalfiltration und die Ultrafiltration. Für die Prüfung dieser Methoden im Hinblick auf ihre Möglichkeit zur Konjugatreinigung und dem besseren Vergleich wurden als Modellsystem monomodale und monodisperse 5 nm Goldnanopartikel und das negativ geladene Peptid CE₁₂W verwendet. Das verwendete Peptid wird über die Thiol-Gruppe der endständigen Aminosäure Cystein an die Partikel gebunden. Die Bindungsstärke der daraus resultierenden Thiolbindung ähnelt der einer kovalenten Bindung. [18] Deshalb kann davon ausgegangen werden, dass die chemisorbierten Liganden sich nicht während der Untersuchung von der Oberfläche lösen und dadurch die Ergebnisse verfälschen.

Der Vorteil an dem ausgewählten System ist, dass bei einer monodispersen Verteilung auf alle Partikel die gleiche Zentrifugalkraft wirkt und so mit gleicher Kraft auf den Boden des Probengefäßes gedrückt werden. Das negativ geladene Peptid wird eingesetzt, da hierbei keine instabilen Konjugate resultieren und somit bei allen Oberflächendosen eine ähnliche Stabilität vermutet wird. Dies kann auch durch die Analyse der Eigenschaften der Konjugate bestätigt werden. (Abbildung 26) Der Primärpartikelindex der AuNP-CE₁₂W-Konjugate bleibt im Bereich der Fehlertoleranz konstant, dies deutet auf eine ähnliche Stabilität aller Konjugate hin. Die Verschiebung des SPR-Peaks weist Werte bis zu $6,4 \pm 1,2$ nm auf, dies ist auf die Änderung der unmittelbaren Umgebung des Nanopartikels aufgrund der angebundenen Peptid-Liganden zurückzuführen. [69, 70, 71]

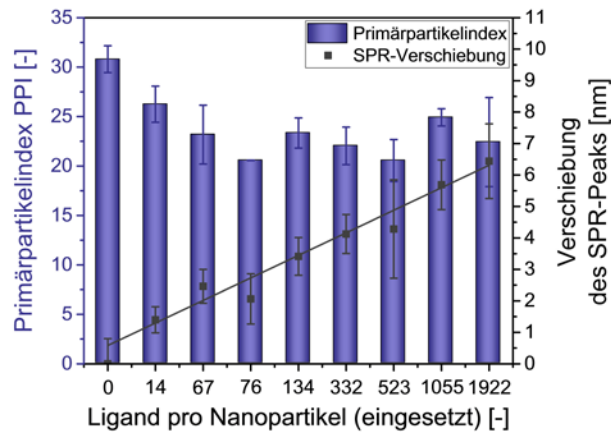


Abbildung 26: Eigenschaften von AuNP-CE₁₂W-Konjugaten: Primärpartikelindex (links) und Verschiebung des SPR-Peaks (rechts).

Aufreinigung mittels Zentrifugalfiltration

Bei der Methode der Zentrifugalfiltration wurden Filtereinsätze mit RC-Membranen (regenerierte Zellulose) mit einem NMWCO (nominellen Molekulargewichts Cut Off) von 30 kDa verwendet. Weiterhin wurden die Experimente bei zwei Geschwindigkeiten, 3000 RPM und 4000 RPM (= 664 x g und 1180 x g) sowie fünf Zentrifugationszeiten (20, 30, 40, 50, 60 min) durchgeführt. Es wurden sechs Reinigungsschritte durchgeführt, um die Parameter für ein Konjugat mit möglichst wenig, idealerweise keinen, freien Liganden in der Probe zu ermitteln. Nach jedem Reinigungsschritt wurde das Filtrat entnommen und spektrometrisch vermessen. Der Rückstand wurde mit MilliQ-Wasser redispergiert und erneut zentrifugiert.

Ein Aspekt zur Beurteilung dieser Methode ist unter anderem die Partikelqualität. Hierzu wurde der Primärpartikelindex herangezogen. Abbildung 27 zeigt die Werte des Primärpartikelindex nach der sechsmaligen Aufreinigung nach 20 min bis 60 min Zentrifugationszeit bei 3000 RPM (A) und 4000 RPM (B). Es ist deutlich zu erkennen, dass die Konjugate in allen Fällen keine signifikanten Einbußen ihrer Stabilität aufweisen. Diese Ergebnisse bestätigen auch die Daten der Goldkonzentration (Anhang: Abbildung 125), welche lediglich für die Messreihe mit 4000 RPM reduzierte Werte von bis zu 20% aufweist. Dies bedeutet jedoch nicht zwangsläufig ein Masseverlust aufgrund des Verfahrens, sondern kann auch ein summierter Effekt aufgrund der Verdünnung nach jedem Zentrifugationsschritt sein. Insbesondere, da dieser Effekt lediglich bei der Messreihe mit 4000 RPM und kleinen Zentrifugationszeiten auftritt.

Eine Ausnahme bezüglich der Stabilität stellen die Proben ohne Liganden (0 Liganden/AuNP) dar, hier sinkt bei allen Proben der PPI von $26,7 \pm 2,7$ auf etwa 12 bei 3000 RPM und etwa 3,5 bei 4000 RPM. Die Destabilisierung in diesem Fall entspricht den Erwartungen, da die Partikel durch die Zentrifugalkraft gegeneinander und auf den Boden des Probengefäßes gedrückt werden. Dies führt ohne die Gegenwart von Liganden zu einer Agglomeration der Partikel. Beim Vergleich der beiden verwendeten Geschwindigkeiten fällt außerdem auf, dass die Partikelqualität bei 4000 RPM bei einer Zentrifugationsdauer von weniger als 40 Minuten um bis zu 15% abnimmt. (Abbildung 27 C) Unter Berücksichtigung der Absolutwerte führt diese Abnahme jedoch nicht zu einer eindeutigen Verschlechterung der kolloidalen Qualität.

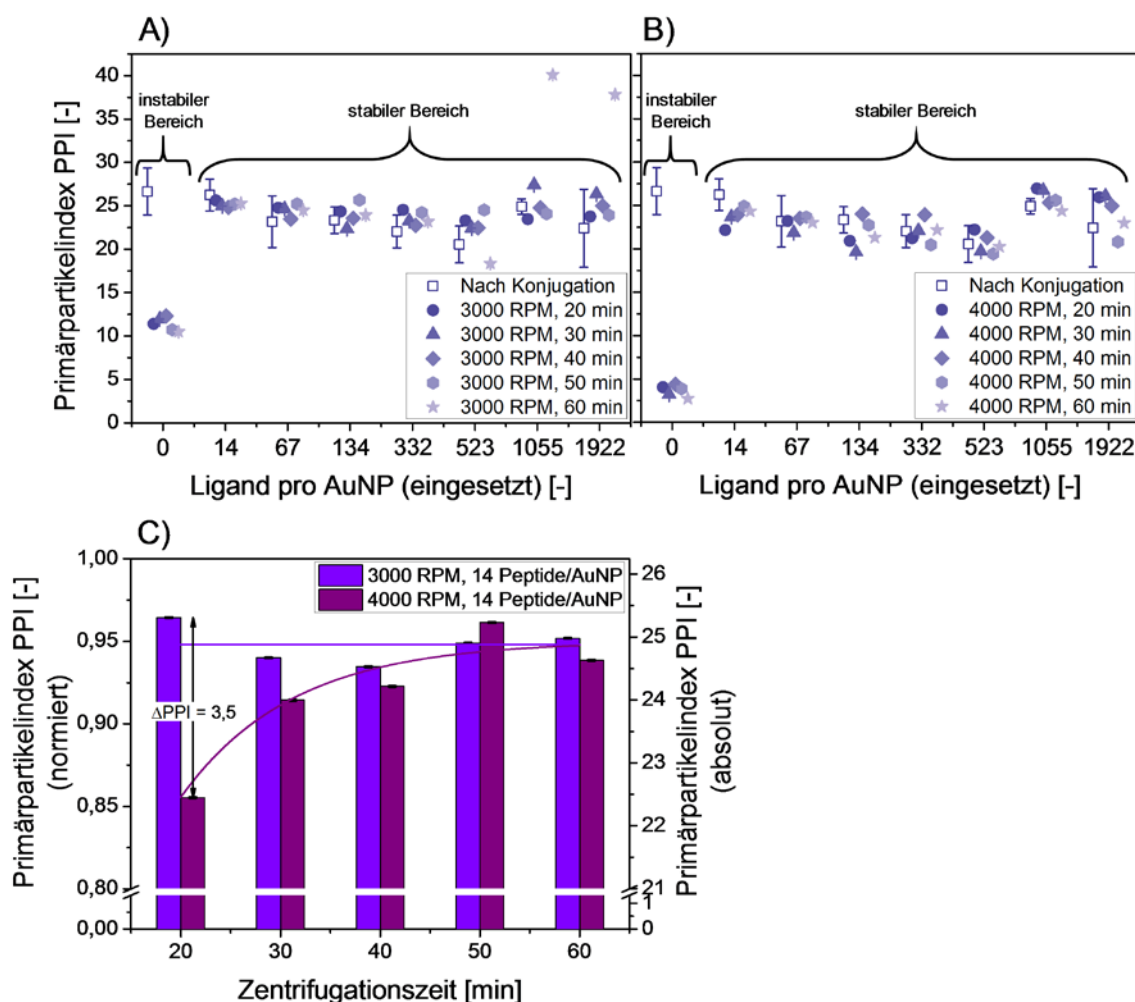


Abbildung 27: Stabilität der Konjugate bei der Zentrifugalfiltration. Primärpartikelindex PPI der AuNP-CE₁₂W-Konjugate vor und nach der Aufreinigung bei verschiedenen Zentrifugationszeiten von 20 min, 30 min, 40 min, 50 min und 60 min mit einer Geschwindigkeit von 3000 RPM (664 x g) (A) und 4000 RPM (1180 x g) (B).

Nach jedem Reinigungsschritt wurde das Filtrat der Proben vermessen und die Menge der Liganden pro Nanopartikel in der Probe bestimmt. (Kalibration befindet sich im Anhang, Abbildung 86 rechts) Somit konnte ermittelt werden, wie viele

Reinigungsschritte notwendig sind, um die Konjugate von ungebundenen Liganden zu trennen. Abbildung 28 zeigt einen Vergleich der Liganden pro Nanopartikel in der Probe für die Zentrifugationszeiten 20 min, 40 min und 60 min bei 3000 RPM und 4000 RPM. Anhand der Ergebnisse wird ersichtlich, dass sich die Menge an Peptid in der Probe erwartungsgemäß verringert, je häufiger die Probe zentrifugiert wird. Dieser Effekt ist jedoch nicht ausgeprägt, was insbesondere bei den Initialkonzentrationen unter 332 Peptiden/AuNP auftritt und auch zu erwarten war, da dies in dem Größenbereich der Maximalbelegung liegt. Die Maximalbelegung kann anhand des ungeladenen Liganden Dodecanthiol angegeben werden. Dieser Ligand besitzt einen Footprint, also den Platzbedarf eines Liganden bei der Anbindung an einen Nanopartikel, von $0,2 \text{ nm}^2$ [206]. Demzufolge beträgt die maximal mögliche Anzahl an Liganden, die eine dicht gepackte Monolage auf einem 5 nm Nanopartikel bilden, 392. Experimentell wurde für dieses Peptid bereits ein Footprint von $0,26 \text{ nm}^2$ ermittelt, dies kommt der Annahme nahe. [207] Aus diesem Grund ist eine konstante Anzahl an Peptiden pro Nanopartikel in diesem Konzentrationsbereich bis 332 Liganden/AuNP nach dem ersten Reinigungsschritt plausibel, da anzunehmen ist, dass nur wenige freie Liganden vorhanden sind. Diese würden bereits im ersten Schritt abgetrennt werden.

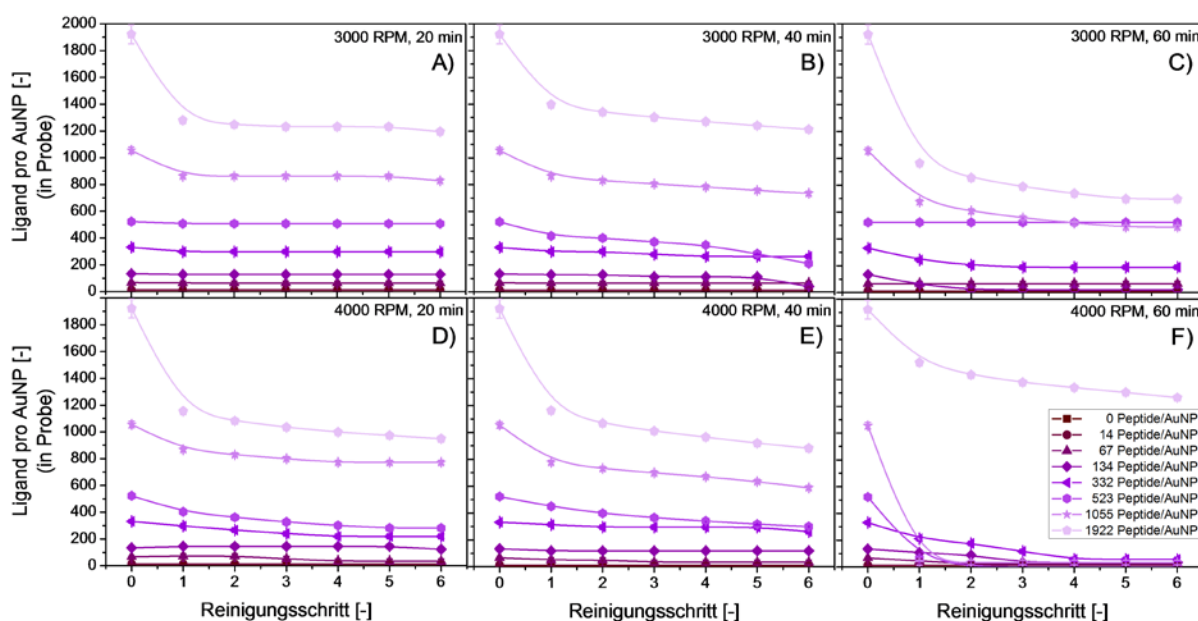


Abbildung 28: Oberflächenbelegung der Goldnanopartikel an CE_{12}W mit unterschiedlichen Initialkonzentrationen von 0 bis 1922 Peptiden pro Nanopartikel, berechnet nach 20 min (A, D), 40 min (B, E) und 60 min (C, F) Zentrifugation bei 3000 RPM ($664 \times g$) (A, B, C) und 4000 RPM ($1180 \times g$) (D, E, F).

Ein beispielhafter Vergleich der prozentualen Anteile anwesender Liganden von Proben mit drei verschiedenen eingesetzten Ligandenkonzentrationen zeigt, dass die

Abtrennung der Liganden nach drei Reinigungsschritten für beide Geschwindigkeiten bereits nach 20 Minuten Zentrifugationsdauer erfolgt. Mit steigender Zentrifugationsdauer sinkt der Anteil anwesender Liganden erwartungsgemäß, was bei 4000 RPM stärker ausgeprägt ist. (Abbildung 29)

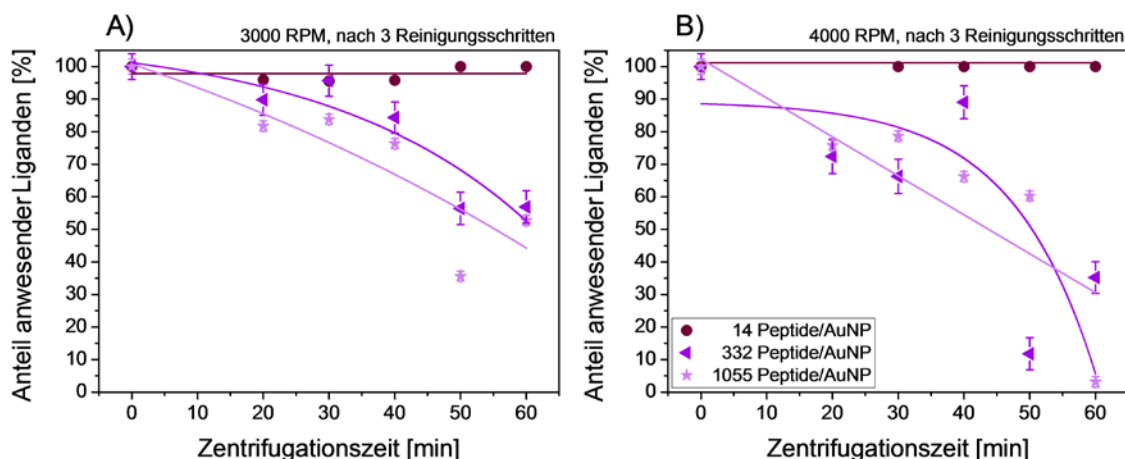


Abbildung 29: Darstellung der Anteile an CE₁₂W-Liganden, welche sich noch in der Probe befinden, mit einer Initialkonzentration von 14, 332 und 1055 Peptiden pro Goldnanopartikel in Abhängigkeit der Zentrifugationsdauer für 3000 RPM (664 x g) (A) und 4000 RPM (1180 x g) (B) nach jeweils drei Reinigungsschritten.

Bei genauerer Betrachtung der Daten wird sichtbar, dass besonders bei den hohen Initialkonzentrationen über 523 Liganden/AuNP mehr als sechs Reinigungsschritte erforderlich sind, da weiterhin ungebundene Liganden vorliegen. Bei kurzen Zentrifugationszeiten von 20 bis 30 Minuten und insbesondere bei 3000 RPM ist die Änderung der Menge an Liganden/AuNP so gering, dass die Zentrifugationsparameter vermutlich nicht ausreichen, um den Transport der Liganden zur und durch die Membran zu sichern. Die Liganden haben ein Molekulargewicht von 1,68 kDa und benötigen für eine Zentrifugation demzufolge hohe g-Kräfte, lange Zentrifugationszeiten oder kurze Sedimentationswege, optimalerweise jedoch eine Kombination aus allen Parametern. In dem vorliegenden Fall ist der Sedimentationsweg ein fester Parameter und liegt bei 2 cm im Vergleich zu 3,5 cm, wie er bei der Zentrifugation in einem standardmäßigen 1,5 mL Zentrifugationsgefäß vorliegt. Bei 4000 RPM und 40 min ist eine Reduktion der Ligandenmenge zu erkennen. Bei der Erhöhung der Zentrifugationsdauer auf 60 Minuten hingegen wird schon bei 3000 RPM deutlich, dass die Liganden besser durch die Membran transportiert werden können. Der deutlichste Effekt, welcher an dem Absinken der Ligandenmenge in Abhängigkeit der Reinigungsschritte zu erkennen ist, tritt bei der Zentrifugation mit 4000 RPM für 60 Minuten auf.

Aus den bereits diskutierten Daten zur Analyse der optimalen Geschwindigkeit und Anzahl an Reinigungsschritten wurden Adsorptionsisothermen erstellt, indem die ermittelte Menge an gebundenen Liganden pro Nanopartikel nach sechsmaliger Zentrifugation gegen die eingesetzte Menge an Peptidliganden aufgetragen wurde. (Abbildung 30) Hierbei ist anzumerken, dass aufgrund einer ineffektiven Trennung von noch immer in der Probe vorliegenden ungebundenen Liganden ausgegangen werden muss. Jedoch bietet die Erstellung von Adsorptionsisothermen die Möglichkeit, die Effektivität des Trennverfahrens nach sechs Reinigungsschritten zu beurteilen.

Es ist zu erkennen, dass sämtliche Daten einen exponentiellen Verlauf aufweisen, wobei jedoch abhängig von der Zentrifugationsdauer die Steigung unterschiedlich ist. Im Allgemeinen gilt, dass die Proben mit geringerer Zentrifugationsdauer eine größere Steigung der Oberflächenbeladung aufweisen, dadurch führen sie generell zu höheren maximalen Bedeckungsgraden. Die Oberflächenbedeckung hängt jedoch ausschließlich von den Konjugationsparametern ab und demnach nicht von den Parametern der Aufreinigungsmethode. Aus diesem Grund sollte theoretisch bei allen Einstellungen zur Aufreinigung die gleiche maximale Oberflächenbeladung erreicht werden. Hieraus kann demnach geschlussfolgert werden, dass Zentrifugationszeiten unter 50 Minuten nicht ausreichen, um die Konjugate vollständig von ungebundenen Liganden zu trennen. Dies gilt sowohl für Geschwindigkeiten von 3000 RPM als auch für 4000 RPM.

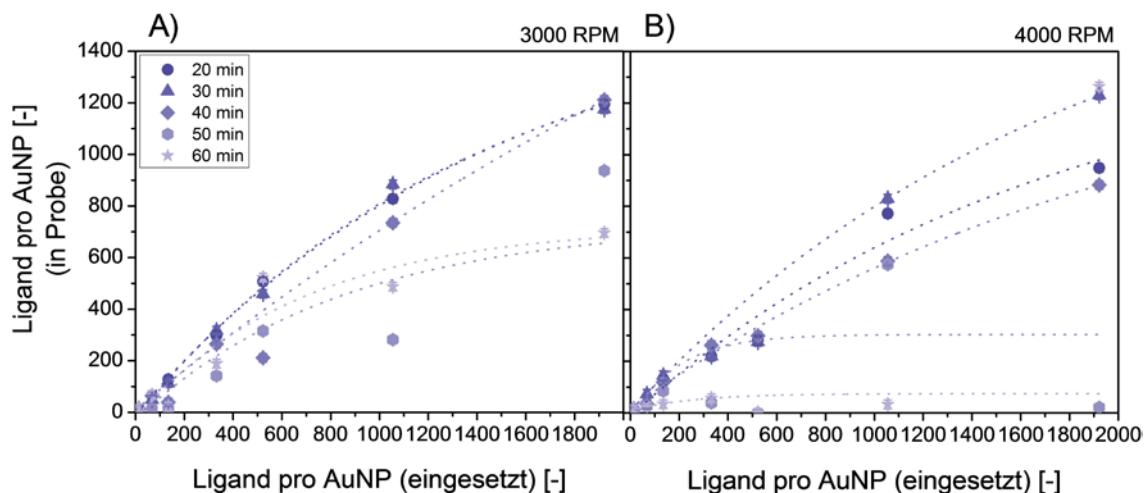


Abbildung 30: Anzahl der Liganden pro Nanopartikel in der Probe nach sechsmaliger Zentrifugation bei 3000 RPM (664 x g) (A) und 4000 RPM (1180 x g) (B) bei verschiedenen Zentrifugationsdauern.

Der Verlauf der exponentiellen Anpassung ähnelt dem einer Freundlich-Isotherme. Auch hier ist der Anstieg flach, dies ist auf die zunehmende Oberflächenbedeckung zurückzuführen. In Verbindung damit steht die Reduktion des zur Verfügung

stehenden Platzes für weitere Liganden und die stärker werdenden Wechselwirkungen zwischen den bereits gebundenen und den noch ungebundenen Liganden. [153] In Bezug auf die Theorie kann sich bei der Freundlich-Isotherme keine gesättigte Monolage ausbilden, da hierbei zu viele wechselwirkende Kräfte zwischen den Liganden und den Nanopartikeln auftreten. Auch diesem Punkt entsprechen die vorliegenden Daten. Zur Absicherung wurden für die Messungen bei einer Zentrifugationsdauer von 50 und 60 Minuten die Anpassungen mit der Funktion der Langmuir-, Freundlich- und Temkin-Isotherme durchgeführt. Die hieraus resultierenden Parameter sind in Tabelle 20 (Anhang) aufgeführt. Die Anpassung über die Freundlich-Isotherme (Anhang: Abbildung 139) ergab die besten Regressionswerte mit einem Korrelationskoeffizienten R^2 von bis zu 0,9. Aus der Anpassung wurde der Heterogenitätsfaktor $1/n$ bestimmt, wodurch in allen Fällen Werte für $n > 1$ ermittelt wurden, dies deutet auf eine physikalische Adsorption hin. [208] Dies widerspricht der Annahme von der Ausbildung einer kovalenten Bindung und bedarf einer genaueren Überprüfung durch Ergänzung des Datensatzes mit weiteren Initialkonzentrationen. Denkbar ist hierbei eine ineffektive Abtrennung ungebundener Liganden, welche sich noch in der Probe befinden und möglicherweise das System beeinflussen.

Aus der *gewöhnlichen* exponentiellen Anpassung ($y = a \cdot \exp(b \cdot c) + c$) der ermittelten Daten für die Anzahl der Liganden pro Nanopartikel in der Probe (Abbildung 30), welche bei fast allen Datenreihen zu einem Korrelationskoeffizienten über 0,88 geführt hat, wurde die Sättigungsbeladung N_{Sat} bestimmt. Die hierfür durchgeführte Anpassung erfolgte anhand von allen Einzelwerten und nicht nur anhand der Mittelwerte. Dies wurde auch mit den Werten für die prozentualen Anteile anwesender Liganden zur Ermittlung der Sättigungseffizienz K_{Sat} durchgeführt. Hierbei ist anzumerken, dass dies die Menge der gebundenen Liganden im Verhältnis zur eingesetzten Ligandenmenge beschreibt. Des Weiteren wurden die Sättigungswerte nicht aus der Anpassung der Freundlich-Isotherme bestimmt, da diese Funktion keine Sättigung beschreibt.

Beide Sättigungs-Werte sind in Abbildung 31 aufgetragen. Sowohl die Sättigungsbeladung als auch die Sättigungseffizienz ist bei geringen Zentrifugationszeiten konstant bei ~1600 Liganden/AuNP und 60-80% und sinkt ab einer Zentrifugationsdauer von 40 min mit steigender Zentrifugationszeit ab. Eine Ausnahme liegt bei K_{Sat} für 3000 RPM vor, hier sinken die Werte ab einer

Zentrifugationsdauer von 30 min. Die hohe Sättigungsbeladung und das Sinken der Sättigungswerte mit steigender Zentrifugationsdauer deuten darauf hin, dass für eine möglichst gute Aufreinigung der Konjugate auch eine hohe Zentrifugationsdauer benötigt wird und bestätigt somit die zuvor aufgestellte These. Weiterhin sind die Werte für die beiden Geschwindigkeiten entweder gleich oder es werden kleinere Werte für 4000 RPM ermittelt. Der geringste Wert der Sättigungsbeladung, welcher hierbei bestimmt werden konnte und bei 4000 RPM und 60 Minuten liegt, beträgt 74,7 Liganden pro Nanopartikel, was 157,9 pmol/cm² entspricht. Dieser Wert stimmt mit der Sättigungsbeladung von einzelsträngigen Oligonukleotiden auf 5 nm Goldnanopartikeln überein. [15]

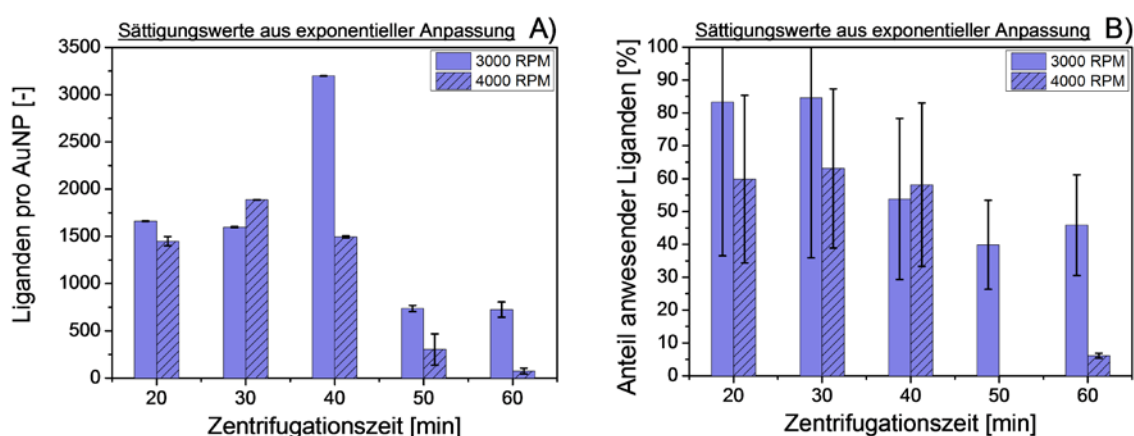


Abbildung 31: Darstellung der theoretisch ermittelten Sättigungsbeladung (A) und der Sättigungseffizienz (B) für verschiedene Geschwindigkeiten (3000 RPM (664 x g); 4000 RPM (1180 x g)) in Abhängigkeit der Zentrifugationsdauer.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Zentrifugalfiltration eine in der Handhabung einfache Methode zur Abtrennung von freien Liganden ist. Jedoch ist bei dieser Methode ein hoher Aufwand mit der Aufreinigung der Konjugate verbunden, weil lange Zentrifugationszeiten von mindestens 60 Minuten bei moderaten Zentrifugalkräften von bis zu 1180 x g erforderlich sind. Weiterhin muss der Reinigungsschritt mehrmals wiederholt werden, um ein zufriedenstellendes Ergebnis zu erzielen. Bei den hierbei angewendeten Parametern bedeutet dies einen zeitlichen Aufwand von 6 Stunden, in denen acht Proben mit jeweils einem Probenvolumen von 1,5 mL gereinigt werden können. Dies gilt jedoch lediglich für die Proben mit einer hohen Initialkonzentration von mindestens 523 Liganden pro AuNP (40 µM Peptid auf 50 µg/mL AuNP). In vielen Experimenten und biologischen Anwendungen ist eine komplette Oberflächenbelegung nicht notwendig und manchmal unerwünscht, wenn

beispielsweise multifunktionale Partikel hergestellt werden sollen. In diesen Fällen können die Konjugate mittels Zentrifugalfiltration bereits nach einem Reinigungsschritt mit mittlerer Zentrifugationsdauer aufgereinigt werden. Ein Verlust der Goldkonzentration, wie er bei der Methode der Gelelektrophorese aufgetreten ist, konnte bei dieser Methode nicht eindeutig nachgewiesen werden. Allerdings sollte über die bereits durchgeführte Analyse der Konjugate auch die Membran untersucht werden und auf Rückstände von beispielsweise freien Liganden geprüft werden.

Aufreinigung mittels Ultrazentrifugation

Die Aufreinigung mittels Ultrazentrifugation ist eine bewährte Methode zur Separation von Substanzen, welche sich in erster Linie in ihrer Masse unterscheiden. Aufgrund der Tatsache, dass sich die Masse von Biomolekülen und Goldnanopartikeln stark voneinander unterscheiden, bietet sich diese Methode für eine Abtrennung von ungebundenen Liganden nach der Biokonjugation von Nanopartikeln an. Die konjugierten Nanopartikel sedimentieren bei der Zentrifugation auf den Boden des Zentrifugationsröhrchens, während die freien Liganden im Überstand vorliegen und durch Pipettieren abgetrennt werden können.

Die Ultrazentrifugation der Konjugate wurde bei 30.000 x g für eine Stunde durchgeführt. Die Überstände wurden abgenommen, die Partikel in MilliQ-Wasser redispergiert und anschließend ein weiteres Mal zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde, wie bei der Zentrifugalfiltration, sechs Mal wiederholt, um eine Methode zu entwickeln, die Konjugate mit möglichst wenig freien Liganden hervorbringt. Weiterhin wurde dies für verschiedene Anfangskonzentrationen des Peptids durchgeführt.

Anhand der Vermessung der Überstände konnte für jeden Zentrifugationsschritt bestimmt werden, wie viele Liganden abgetrennt wurden. Dies bedeutet jedoch nicht, dass auch alle Liganden in der Probe an den Nanopartikeln gebunden sind. Aus diesem Grund wurden mehrere Reinigungsschritte durchgeführt. Die Veränderung der Anzahl an Peptidliganden pro Nanopartikel in der Probe und des Anteils anwesender Liganden nach den jeweiligen Reinigungsschritten sind in Abbildung 32 dargestellt.

Es ist zu erkennen, dass die Anzahl an Liganden in der Probe mit zunehmender Anzahl an Reinigungsschritten sinkt, da nach jeder weiteren Zentrifugation weitere, nicht gebundene, Liganden entfernt werden. Der Verlauf wird schließlich, abhängig von der eingesetzten Ligandendosis, konstant und erreicht somit die maximale

Oberflächendosis. Dieser Wert entspricht der tatsächlichen Oberflächenbedeckung und gleichzeitig kann durch das Verhältnis der gebundenen Liganden im Sättigungsbereich der Kurve zu der eingesetzten Ligandenmenge die Konjugationseffizienz ermittelt werden. Das Absinken der Ligandenmenge in der Probe ist umso flacher, je weniger Liganden zuvor eingesetzt wurden und ähnelt somit einem exponentiellen Abfall.

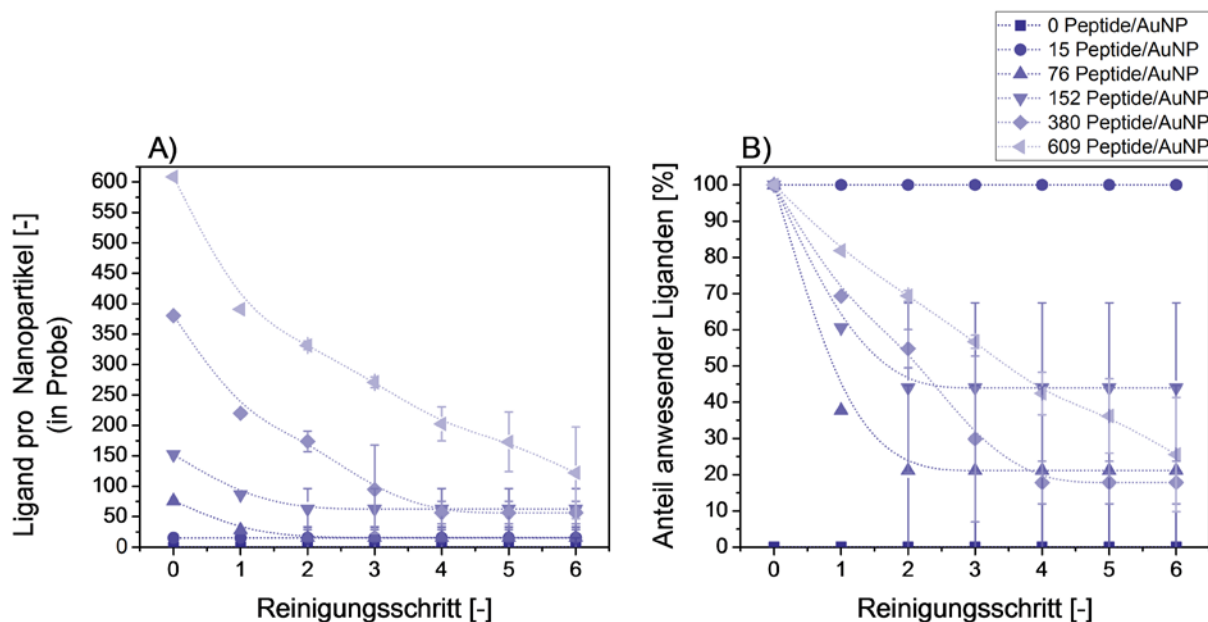


Abbildung 32: Aufreinigung von AuNP-CE₁₂W-Konjugaten mittels Ultrazentrifugation. Darstellung der gebundenen Anzahl an Liganden pro Nanopartikel (A) und des prozentualen Anteils anwesender Liganden (B) in Abhängigkeit der Reinigungsschritte unter Verwendung von verschiedenen Anfangskonzentrationen.

Der Grund für die unterschiedlichen Steigungen kann in der Verdünnung der Liganden liegen. Zu Beginn ist noch eine hohe Menge an Liganden frei in der Probe, welche abgetrennt werden kann. Mit jedem weiteren Schritt werden die freien Liganden weniger, wodurch die Möglichkeit besteht, freie Liganden, welche sterisch in der Ligandenhülle der Partikel eingeschlossen waren, auszuspülen. Die maximal mögliche Reinigung der Partikel wird für die unteren Peptidkonzentrationen bis 152 Liganden pro NP nach zwei Zentrifugationsschritten erreicht. Bei dem Einsatz von 380 Liganden pro AuNP sind vier Durchgänge notwendig und ab 609 Liganden pro AuNP ist nach sechs Durchgängen der Aufreinigung noch kein konstanter Wert erreicht. Diese Erkenntnis wird durch die Werte für den prozentualen Anteil anwesender Liganden bestätigt.

Aus der Oberflächenbelegung kann jedoch eine maximal mögliche Oberflächenbedeckung von $59,6 \pm 4,2$ Liganden pro Nanopartikel ermittelt werden, da sich die Werte der Messreihen ab 152 eingesetzten Liganden diesem Wert annähern.

Anzumerken ist hierbei jedoch, dass diese Angabe nur verlässlich für eingesetzte Ligandendosen bis 380 Liganden/AuNP ist, größere Initialkonzentrationen nähern sich diesem Wert zwar an, benötigen aber vermutlich mehr Reinigungsschritte und können demnach nicht mit einbezogen werden. Aufgrund der Tatsache, dass die Werte des prozentualen Anteils anwesender Liganden die gleiche Tendenz zeigen wie die Belegungswerte, ist auch hierbei eine Annäherung an einen maximalen Anteil anwesender Liganden erkennbar. Diese liegt bei $19,5 \pm 2,3\%$ und wird durch alle Ligandendosen ab 76 Liganden/AuNP, mit Ausnahme der Messreihe mit 152 eingesetzten Liganden pro NP, beschrieben. Hierbei liegt der Wert bei $44,0 \pm 23,5\%$.

Im Folgenden wurde aus den ermittelten Belegungsdaten eine Adsorptionsisotherme erstellt, indem die Werte für die Oberflächenbedeckung und Konjugationseffizienz nach dem sechsten Reinigungsschritt gegen die eingesetzte Menge an Liganden pro Nanopartikel aufgetragen wurden. An dieser Auftragung ist zu erkennen, dass die Oberflächenbeladung mit steigender Initialkonzentration der Liganden exponentiell steigt. Mit Hilfe einer exponentiellen Anpassung konnte ein Sättigungswert von $135,3 \pm 7,5$ Liganden pro Nanopartikel bestimmt werden, dieser wird in Abbildung 33 durch die violette gestrichelte Linie dargestellt.

Über den Sättigungswert kann weiterhin der theoretisch mögliche Footprint, also der Platzbedarf dieses Liganden auf einem Nanopartikel berechnet werden. Mit Hilfe der Formel 5 aus Kapitel 3.4 kann der Footprint von CE₁₂W auf 5 nm Goldnanopartikeln auf $0,58 \text{ nm}^2$ bestimmt werden. Der experimentell erreichte maximale Wert liegt bei $122,1 \pm 75,3$ Liganden pro Nanopartikel, was einem Footprint von $0,64 \pm 0,40 \text{ nm}^2$ entspricht. Sowohl der theoretische als auch der experimentell bestimmte Footprint von CE₁₂W auf 5 nm Goldnanopartikel weicht von dem in der Literatur beschriebenen Wert von $0,26 \text{ nm}^2$ ab. [207] Der Grund hierfür kann in der Aufreinigungsmethode liegen, da es sich bei der in der Literatur beschriebenen Methode um die Ultrafiltration handelt. Auch erfolgte bei diesen Experimenten die Aufreinigung bei optimierten Bedingungen, wobei der pH-Wert und die Salinität variiert wurden, um eine möglichst effiziente Abtrennung der Liganden zu ermöglichen. Dies erfolgte hierbei nicht. Die Konjugationseffizienz folgt ebenfalls einem exponentiellen Verlauf und ergibt schließlich eine minimale Effizienz von $18,4 \pm 0,9\%$. Diese ist in Abbildung 33 durch die graue gestrichelte Linie gekennzeichnet.

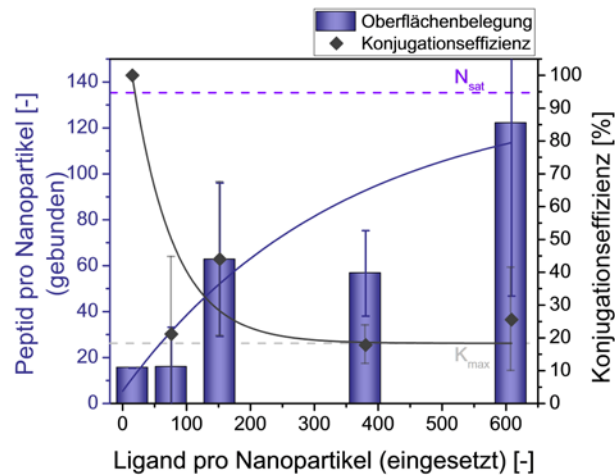


Abbildung 33: Darstellung der maximalen Oberflächenbelegung (links) und Konjugationseffizienz (rechts) abhängig von der eingesetzten Menge an Liganden pro Nanopartikel.

Auch bei diesem Experiment wurden die Daten durch die Langmuir-, Freundlich- und Temkin-Isotherme angepasst. Abbildung 144 und Tabelle 21 (Anhang) zeigen, dass die Temkin- und Langmuir-Isotherme aufgrund einer Korrelation von $R^2 < 0,3$ eine unzureichende Anpassung der Daten aufweisen. Die Anpassung durch die Freundlich-Isotherme erreicht eine Korrelation von $R^2 = 0,98$. Dies stimmt mit den Daten aus der Zentrifugalfiltration überein. Auch hierbei wurde für die Bestimmung des Parameters n mit 1,8 ein Wert größer 1 ermittelt, dies deutet auf eine physikalisch bindende Adsorption hin. [208]

Die ermittelte minimale Konjugationseffizienz von 18,4% bei Initialkonzentrationen von größer 300 Liganden pro Nanopartikel, was in dem vorliegenden Experiment einer Peptidkonzentration von etwa 20 μM auf 50 $\mu\text{g/mL}$ 5 nm Goldnanopartikeln entspricht, kann nicht auf höhere Konzentrationen übertragen werden. Bei dem Einsatz von mehr Liganden wird die Konjugationseffizienz weiter sinken, da die Adsorption bei diesem System nach der Freundlich-Isotherme beschrieben wird. Es bestehen Wechselwirkungen zwischen den Liganden, wie eine Abstoßung aufgrund ihrer Ladung. [153] Auch, wenn anhand der Datenanpassung ermittelt wurde, dass es sich bei dieser Adsorption um einen physikalischen Prozess handelt, kann davon ausgegangen werden, dass die Bindung der Liganden an die Nanopartikel hauptsächlich durch eine starke Au-S-Bindung der Thiol-Gruppe des endständigen Cysteins, welche einer kovalenten Bindung ähnelt, erfolgt. [200] Für eine eindeutige Bestimmung der Bindungsart müsste in diesem Fall die Bindungsstärke der Au-S-Bindung bestimmt werden.

Im Folgenden soll ein Vergleich der ermittelten Maximal- und Sättigungswerte für AuNP-CE₁₂W-Konjugate, welche durch Zentrifugalfiltration und Ultrazentrifugation aufgereinigt wurden, durchgeführt werden. Schließlich sollen die ermittelten Footprints aus den beiden Methoden verglichen werden. (Tabelle 1)

Tabelle 1: Aufstellung der Maximal- (N_{Max}) und Sättigungsbeladung (N_{Sat}), welche mittels Ultrazentrifugation und Zentrifugalfiltration ermittelt wurden. Die daraus berechneten Werte für den Footprint K sind ebenfalls aufgeführt.

		Ultrazentrifugation	Zentrifugalfiltration			
		30.000 x g	3000 RPM (664 x g)		4000 RPM (1180 x g)	
		60 min	50 min	60 min	50 min	60 min
Theoretisch	N_{Sat}	$135 \pm 7,5$	$737 \pm 33,2$	$725 \pm 80,9$	303 ± 165	$74,7 \pm 31,0$
	K [nm ²]	$0,580 \pm 0,03$	$0,11 \pm 0,004$	$0,11 \pm 0,012$	$0,26 \pm 0,14$	$1,05 \pm 0,44$
Experimentell	N_{Max}	$122 \pm 75,3$	$937 \pm 15,7$	$696 \pm 15,9$	$575 \pm 16,0$	$1264 \pm 15,9$
	K [nm ²]	$0,640 \pm 0,39$	$0,08 \pm 0,001$	$0,11 \pm 0,003$	$0,14 \pm 0,004$	$0,06 \pm 0,001$

Die Sättigungswerte der Oberflächenbeladung aus der exponentiellen Anpassung der Messdaten sind in allen Fällen, außer für die Parameter 4000 RPM und 60 min, mit den theoretisch bestimmten Werten vergleichbar. Dies bedeutet, dass bei diesen Experimenten die Oberfläche der Nanopartikel optimal für die Bindung der Liganden ausgenutzt werden konnte. Auffällig sind jedoch die Differenzen zwischen den beiden Methoden, da bei der Zentrifugalfiltration das 2- bis 8-fache der über die Ultrazentrifugation ermittelten Beladung bestimmt wurde. Wie bereits bei der Analyse der Zentrifugalfiltration erwähnt, ist es möglich, dass bei dieser Methode die Abtrennung der freien Liganden ineffizient aufgrund einer zu geringen Triebkraft ist. Dies kann durch die Erhöhung der Geschwindigkeit und Zentrifugationsdauer verbessert werden.

Im Vergleich mit der Literatur, in der die Konjugation dieses Liganden an Goldnanopartikel zu einer maximalen Belegung von 297 ± 51 Liganden/AuNP [207] führte und eine Monolage mit 79 Liganden/AuNP [209] bestimmt wurde, scheint die Aufreinigung mittels Zentrifugalfiltration nicht ausreichend zu sein. Der Grund ist, dass sich hierbei mit mindestens 575 ± 16 Liganden/AuNP deutlich mehr Liganden in der Probe befinden. Oligonukleotide, welche stärker geladen sind, führen vergleichsweise

zu einer Oberflächenbeladung von $74,8 \pm 2,1$ Liganden pro Nanopartikel. [15] Der Footprint von kleinen Molekülen wie Trinatriumcitrat und des ungeladenen Dodecanthiols beträgt $0,3 \text{ nm}^2$ und $0,2 \text{ nm}^2$. [153, 210] Da das hierbei verwendete Peptid jedoch mit einer Nettoladung von -12 eine vergleichsweise starke Ladung trägt und dadurch vermehrte Wechselwirkungen wie Abstoßungskräfte auftreten, ist es realistisch, dass der Footprint nicht kleiner als $0,2 \text{ nm}^2$ sein kann. Auch dies führt dazu, dass die Ultrazentrifugation, welche zu dem experimentell bestimmten Footprint von $0,58 \pm 0,03 \text{ nm}^2$ führt, in Bezug auf die effiziente Reinigung von Goldnanopartikel-Konjugaten geeigneter erscheint.

Aufgrund der starken Kräfte auf die Nanopartikel während der Ultrazentrifugation wurden die Partikel nach dem Aufreinigungsprozess nochmals im Hinblick auf ihre optischen Eigenschaften und eines eventuellen Goldverlustes untersucht. Für diese Untersuchung wurden auch Konjugate mit NLS_{Cys} und SAP verwendet. In Abbildung 34 A ist ersichtlich, dass der Goldverlust bei der Ultrazentrifugation von Konjugaten mit NLS_{Cys} bei bis zu 80-100% liegt. In diesem Fall steigt der Verlust mit steigender Initialkonzentration an, dies kommt jedoch durch den Ladungsausgleich zwischen dem positiv (+3) geladenen NLS_{Cys} und den negativ geladenen Goldnanopartikeln zustande, woraus eine grundsätzliche Destabilisierung der Partikel resultiert.

Die beiden negativ geladenen Peptide CE₁₂W und SAP weisen in diesem Fall unterschiedliche Effekte auf. Während die erhaltene Goldmenge bei SAP-Konjugaten nur etwa 80% über den gesamten untersuchten Bereich beträgt, ist der Erhalt bei CE₁₂W-Konjugaten zunächst mit 0% sehr gering und wächst dann mit steigender Initialkonzentration. Der Grund kann hierbei die Struktur der Substanzen sein. Da CE₁₂W lediglich 14 Aminosäuren enthält und 12 davon negativ geladen sind, wird es bei neutralem pH-Wert komplett geladen sein und von daher gestreckt vorliegen. SAP besteht aus 19 Aminosäuren und ist insgesamt dreifach negativ geladen bei pH 7. Auch wenn CE₁₂W stärker negativ geladen ist, reicht dies in Verbindung mit der geringen Menge an Liganden im unteren Bereich der Initialkonzentration nicht aus, um die Konjugate ausreichend zu stabilisieren. Es ist eine sterisch anspruchsvollere Struktur notwendig, wie bei SAP, um die Partikel auch im Bereich kleiner Konzentrationen zu stabilisieren. In diesem Fall faltet sich das Peptid vermutlich

zusammen und legt sich auf die Partikel. Der Verlust der Goldmenge von 43,6% bei etwa 150 CE₁₂W-Liganden ist bei dieser Methode fast doppelt so hoch wie bei der Zentrifugalfiltration, bei der der Goldverlust unabhängig von der Oberflächenbeladung der Partikel ist.

Dies ist auch an der Verschiebung des SPR-Peaks (Abbildung 34 B) zu erkennen, da hierbei kaum eine Verschiebung, welche aufgrund einer Agglomeration der Partikel oder der Anbindung von Liganden an der Oberfläche zustande kommt, ersichtlich ist. Die AuNP-CE₁₂W-Konjugate weisen eine signifikante Verschiebung des SPR-Peaks von bis zu 70 nm auf, dies kann einerseits aufgrund einer Streckung des Peptids und andererseits durch eine mögliche Agglomeration der Partikel zustande kommen.

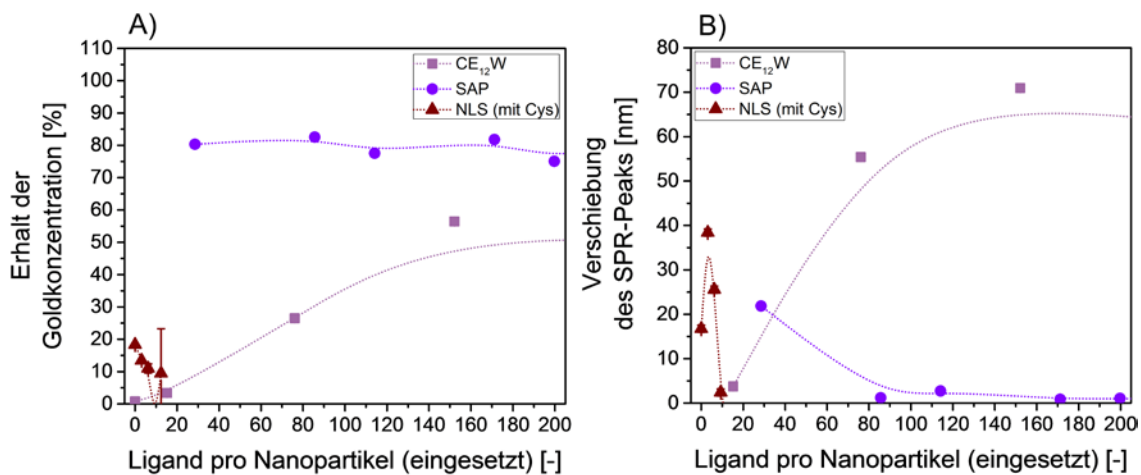


Abbildung 34: Verbliebene Goldkonzentration (A) und die Verschiebung des SPR-Peaks (B) von Konjugaten, welche mit verschiedenen Peptiden synthetisiert wurden, nach der Aufreinigung mittels Ultrazentrifugation.

Die Methode der Ultrazentrifugation ist eine effiziente Methode zur Abtrennung von freien Liganden aus einem Konjugat. Es ist möglich nach zwei bis vier Reinigungsschritten, abhängig von der Initialkonzentration der Liganden, die Konjugate aufzureinigen, so dass keine messbaren freien Liganden mehr in der Probe vorliegen. Die hierbei ermittelte Sättigungskonzentration liegt bei $135 \pm 7,5$ Liganden/NP, während die maximal bestimmte Oberflächenbedeckung mit $122 \pm 75,3$ Liganden/NP bestimmt wurde. Bei der Ultrazentrifugation von agglomeratbildenden Konjugaten werden die Partikel durch die Zentrifugalkraft noch stärker aneinander gebracht, was schließlich zu einem Verlust der Stabilität und Goldkonzentration führen kann. Daher ist abhängig vom Peptid möglicherweise ein Konzentrationsüberschuss an eingesetzten Liganden notwendig, um die Konjugate ausreichend zu stabilisieren, obwohl dies auch eine niedrige Konjugationseffizienz zur Folge hätte.

Zusammenfassend bieten alle drei Methoden, die Gel-Elektrophorese, die Zentrifugalfiltration und die Ultrazentrifugation, ihre Vorteile zur Abtrennung von ungebundenen Liganden. Die Gel-Elektrophorese weist den entscheidenden Nachteil auf, dass hierbei keine direkte Aussage über die Oberflächenbedeckung getätigt werden kann. Liganden können nur mit erhöhtem Aufwand wieder zurückgewonnen werden. Weiterhin müssen agglomeratbildende Partikel nachstabilisiert werden, dies kann für die weitere Verwendung der Konjugate, wie beispielsweise für eine weitere Konjugation oder biologische Anwendungen, nachteilig sein. Dies ist insbesondere zu beachten, wenn multifunktionelle Konjugate mit definierter Beladung hergestellt werden sollen. Auch polydisperse Proben können nur teilweise wieder zurückgewonnen werden. Diese Probleme gibt es bei den Zentrifugationsmethoden nicht. Allerdings werden auch bei der Ultrazentrifugation stabile Partikel benötigt, dies kann jedoch durch die Anwesenheit von bereits geringen Ligandenmengen gelöst werden. Für die Reinigung von agglomeratbildenden Partikeln können die Zentrifugationsparameter angepasst werden, sodass die Redispergierung der Partikel erleichtert wird und die Konjugatqualität nicht verschlechtert wird. Eine Alternative wäre die Zentrifugalfiltration, da hierbei zur Trennung auch geringere g-Kräfte genutzt werden können. Bei sehr hohen Initialkonzentrationen erfordert die Reinigung von Konjugaten einen hohen Aufwand. Dieser kann jedoch durch Anpassung von Geschwindigkeit und Zentrifugationsdauer ausgeglichen werden und ist für die Reinigung von Konjugaten mit relevanten Ligandenkonzentrationen unterhalb von 332 Liganden/AuNP vergleichbar mit dem Aufwand für die Ultrazentrifugation.²²

²² Weitere Ergebnisse sind ergänzend in Kapitel 7.8.5. im Anhang zu finden.

4.2.4. Einfluss von Oligonukleotiden auf Goldnanopartikel-Konjugate



In dem nachfolgenden Kapitel soll der Einfluss von Oligonukleotiden auf die Eigenschaften der resultierenden Konjugate untersucht werden. Es soll sowohl die Inkubationsdauer als auch der Einfluss der verwendeten Salztypen, die Sequenzlänge und die Existenz eines Platzhalters untersucht werden.²³ Die Basis hierzu ist dadurch gegeben, dass alle Sequenzen eine Spezifität im Hinblick auf das bovine Y-Chromosom aufweisen und somit im weiteren Verlauf der Arbeit bei Penetrations- und Hybridisierungsexperimenten eingesetzt werden sollen.

Untersuchung der experimentellen Parameter der Inkubationszeit und des Salztyps

Wie bereits bei der Untersuchung von Peptid-Konjugaten erwähnt, stellt die Ladung der jeweiligen an einer Konjugation beteiligten Substanzen einen wesentlichen Aspekt dar. Tragen die Substanzen entgegengesetzte Ladungen, so ist dies die Triebkraft der Konjugation, da bereits eine Anziehung besteht, woraus die Ausbildung der Au-S-Bindung erfolgen kann. Im Gegensatz hierzu, lassen sich gleich geladene Reaktionspartner schwieriger miteinander vereinigen. Dies gilt insbesondere, wenn beide Seiten jeweils sehr stark negativ oder positiv geladen sind. Dieser Fall liegt bei der Oligonukleotid-Konjugation von Goldnanopartikeln vor. Für diesen Ansatz ist jedoch bereits in der Literatur ein Protokoll beschrieben worden [16, 97, 165, 211], um die Abstoßung zwischen den Gegenseiten zu verringern und somit eine effizientere Konjugation zu ermöglichen. Nach dem Vermischen der Partikel mit den Oligonukleotiden wird schrittweise eine hochkonzentrierte Salzlösung, beispielsweise Natriumchlorid, zu dem Gemisch gegeben, um schließlich eine molare Salzkonzentration zu erreichen ohne dass die Partikel agglomerieren. Es gibt verschiedene Ansätze für dieses Protokoll, jedoch wurde noch nicht systematisch untersucht, welche Inkubationsdauer nach diesem „Salt-Aging“-Prozess optimal ist.

In dem folgend beschriebenen Experiment wurde die Konjugation von Goldnanopartikeln mit dem Oligonukleotid 5'LNA30_{T10} durchgeführt und die Inkubationsdauer nach dem Zugabe einer Natriumchlorid-Lösung bis zu einer

²³ Die für diese Experimente verwendeten Sequenzen wurden in Zusammenarbeit mit den Wissenschaftlern des Friedrich-Löffler-Instituts (Institut für Nutztiergenetik) unter der Leitung von Prof. Dr. Detlef Rath ausgewählt.

Endkonzentration von 0 - 0,5 mol/L zwischen 24 und 168 Stunden variiert. Hierbei wurde die NaCl-Lösung in fünf Schritten nach jeweils 20 Minuten pro Schritt zugegeben. (Anhang: Kapitel 7.2.2.1) Die Oberflächenbedeckung wurde nach der Aufreinigung mittels Ultrazentrifugation bestimmt, indem der Überstand spektrometrisch vermessen wurde, die Menge an ungebundenen Liganden bestimmt wurde und somit auf die Menge gebundener geschlossen werden konnte. (Die Kalibration befindet sich im Anhang, Kapitel 7.8.1)

Die Oberflächenbeladung der 5'LNA30_{T10} auf lasergenerierte Goldnanopartikel ist in Abbildung 35 A dargestellt. Der Theorie nach erfolgt eine gesteigerte Beladung in Abhängigkeit der Salzkonzentration [16], was in diesem Fall jedoch nicht signifikant ausfällt. An dieser Stelle soll jedoch nicht weiter auf diesen Effekt eingegangen werden, da der Einfluss der Inkubationsdauer hier im Fokus liegen soll. Aus den beschriebenen Daten zur Oberflächenbelegung in Abhängigkeit der NaCl-Konzentration wurde durch exponentielle Anpassung der Messdaten die maximale Oberflächenbeladung (Abbildung 35 B) ermittelt, um einen für dieses System realistischen Maximalwert zu erhalten. Die maximale Oberflächenbelegung verändert sich nicht deutlich über den untersuchten Zeitraum und liegt zwischen 5,7 und 6,7 LNA pro AuNP. (Abbildung 35) Die Konjugationseffizienz weist einen gleichen Verlauf auf und liegt zwischen 39,6% und 45,6%. Dies weist bereits auf einen von der Inkubationsdauer unabhängigen Effekt hin.

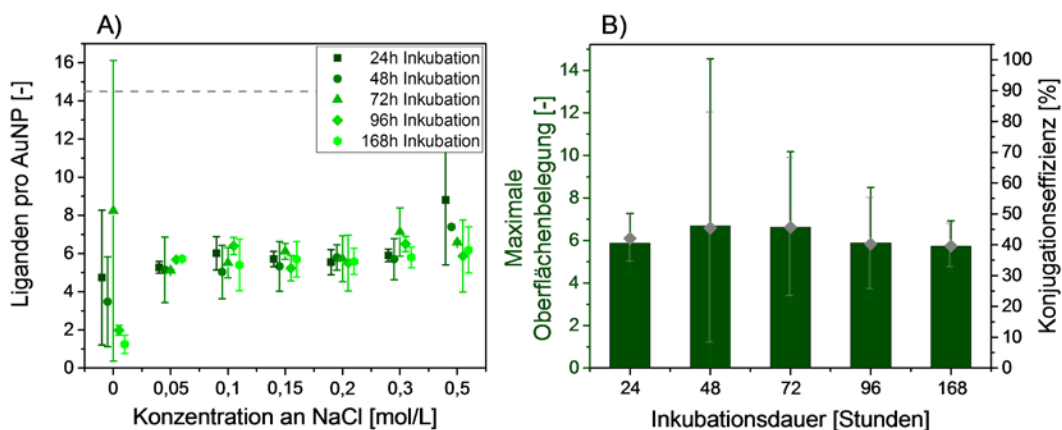


Abbildung 35: Oberflächenbelegung der AuNP-5'LNA30_{T10}-Konjugate. Darstellung der Liganden/AuNP in Abhängigkeit der Natriumchlorid-Konzentration (0 – 0,5 mol/L) und der Inkubationsdauer (24 – 168 h) nach der Aufreinigung mittels Ultrazentrifugation. (A) Darstellung der maximalen Oberflächenbelegung (links) und der Konjugationseffizienz (rechts) von 5'LNA30_{T10} auf lasergenerierte Goldnanopartikel in Abhängigkeit der Inkubationsdauer. (B) Die eingesetzte Oligonukleotid-Konzentration beträgt 1,3 μ M.

Die Betrachtung des Primärpartikelindex und der Verschiebung des SPR-Peaks der Konjugate nach der entsprechenden Inkubationsdauer, aber vor der Aufreinigung (Abbildung 36 A und D) mittels Ultrazentrifugation, zeigt einen in Abhängigkeit der

Inkubationsdauer ansteigenden Trend. (vgl. Abbildung 36 C) Die Werte liegen bei einem PPI zwischen 13,6-15,5 und 21,5-24,5 und einer SPR-Verschiebung zwischen 7 und 8 für NaCl-Konzentrationen größer 0 mol/L. Ohne NaCl liegt die SPR-Verschiebung zwischen 3,6 und 7,9. Dieser ansteigende Trend nach Einsatz von NaCl weist einerseits auf einen stabilisierenden Effekt hin und bestätigt andererseits die Anbindung einer vermehrten Anzahl an Liganden mit mindestens 0,05 mol/L NaCl. (Abbildung 35 A)

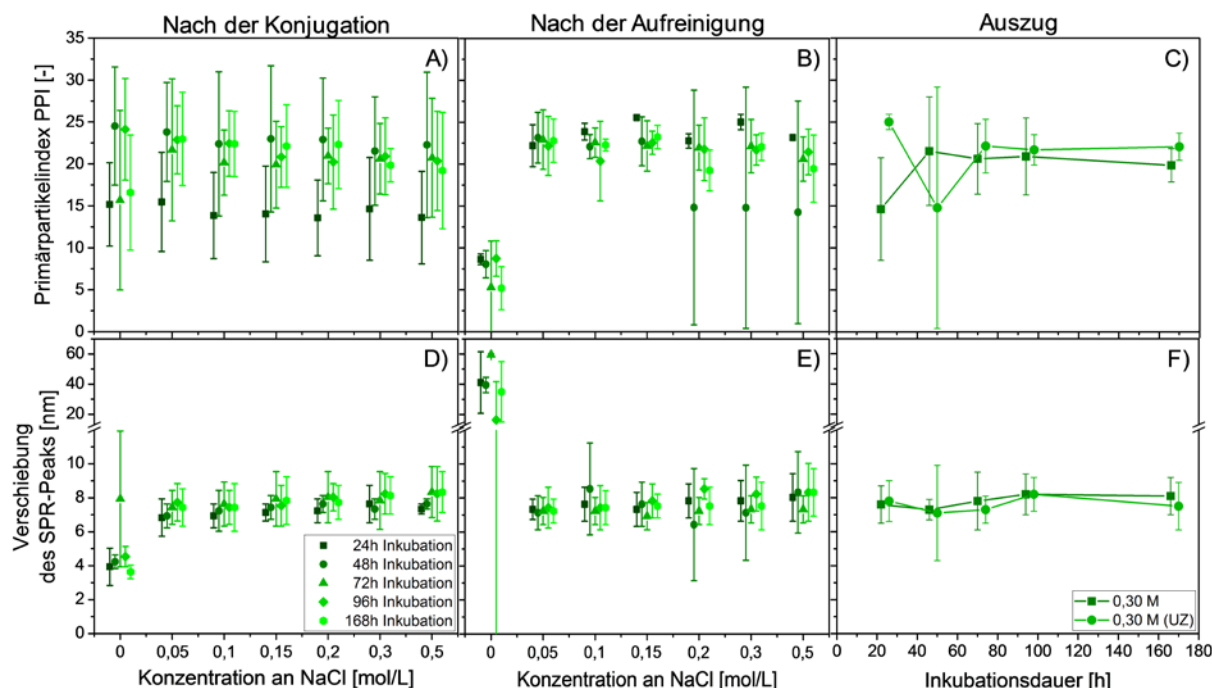


Abbildung 36: Stabilität der AuNP-5'LNA30T10-Konjugate dargestellt als Primärpartikelindex (A, B, C) und Position des SPR-Peaks (C, D, E) in Abhängigkeit der Natriumchlorid-Konzentration (0 – 0,5 mol/L) und der Inkubationsdauer (24 – 168 h) nach der Konjugation (A und D) und nach der Aufreinigung mittels Ultrazentrifugation (B und E). Für 0,3 M NaCl ist ein Auszug des PPI in Abhängigkeit der Inkubationsdauer vor und nach der Aufreinigung dargestellt. (C, F) Die eingesetzte Oligonukleotid-Konzentration beträgt 1,3 μ M.

Anhand dieser Beobachtung kann erwartet werden, dass die Proben mit einer höheren Inkubationszeit nach der Aufreinigung stabiler sind. Dies wird jedoch nicht bestätigt. (Abbildung 36 B und E) Nach der Aufreinigung ist für NaCl-Konzentrationen größer 0 mol/L keine deutliche Tendenz des Primärpartikelindex und der Verschiebung des SPR-Peaks zu erkennen. Die Werte sind für alle Inkubationszeiten gleich und liegen bei der SPR-Verschiebung bei etwa 7 nm und bei dem PPI bei etwa 23. (vgl. Abbildung 36 C und F) Die PPI-Werte ab 0,2 mol/L für eine Inkubationsdauer von 48 Stunden weisen mit über 90% hohe Standardfehler auf. Für die anderen Werte tritt dieser Effekt jedoch nicht auf, so dass diese Fehler als Ausreißer betrachtet werden. Bei weiterer Betrachtung dieses Konzentrationsbereiches ist eine Abnahme des PPI in Abhängigkeit der Inkubationsdauer von bis zu 3,7 PPI-Werten zu verzeichnen. Dies

könnte darauf hindeuten, dass die längere Inkubationsdauer dazu führt, dass mehr Gegenionen sich an die Oligonukleotide anlagern und dadurch auch die gebundenen Goldnanopartikel destabilisieren. Es ist hierbei anzumerken, dass die Konjugate einen geringeren PPI haben, aber mit einem Wert von 19 und größer immer noch als stabil eingestuft werden können. [72, 73, 85]

Die Konjugate ohne NaCl-Zugabe (0 mol/L) weisen reduzierte Werte sowohl beim PPI als auch bei der SPR-Verschiebung auf, dies ist auf eine um den Faktor 3 geringere Oligonukleotid-Beladung zurückzuführen. Diese geringere Beladung wird durch die geringere SPR-Verschiebung (Abbildung 36 D) bereits angedeutet. Die Goldkonzentration der Konjugate bleibt sowohl in Abhängigkeit der NaCl-Konzentration als auch in Abhängigkeit der Inkubationsdauer konstant und weist keine signifikanten Verluste auf. (Anhang: Abbildung 146)

Aufgrund der Tatsache, dass bereits nach 24 Stunden kein signifikanter Effekt mehr in der Oberflächenbelegung, welche 5 bis 6,5 Liganden/AuNP beträgt (Abbildung 35 A), auftritt und dass auch nach der Aufreinigung keine Unterschiede in der Stabilität der Konjugate vorzufinden sind, werden im Folgenden die Konjugate nach der Salz-Alterung 24 Stunden inkubiert und anschließend für die weitere Verwendung mittels Ultrazentrifugation aufgereinigt.

Bei der Oligonukleotid-Konjugation ist das Abschirmen der Ladungen durch die Salzzugabe ein wesentlicher Aspekt. Im Weiteren sollte untersucht werden, ob dies den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Reaktion darstellt oder die Dauer der Inkubation. Dies würde auf die Salzzugabe zutreffen, wenn die Inkubation der Proben länger als 1 Stunde und 45 Minuten dauern würde, denn dies entspricht der Dauer der Salzzugabe.

Nach der Inkubationsdauer soll untersucht werden, welches Salz sich bezüglich Stabilität und Oberflächenbelegung der Partikel am besten für die Salzalterung (engl.: Salt-Aging) während der Konjugation von Oligonukleotiden eignet. Hierbei soll zwischen Natriumchlorid, wie es in der Literatur beschrieben wird [16, 165, 211], und Natriumphosphatpuffer, welcher bereits im mikromolaren Konzentrationsbereich in dem Kolloid vorliegt, entschieden werden.

Zunächst soll die Stabilität der Konjugate nach der Konjugation, aber vor der Aufreinigung, bewertet werden. Hierzu wird der Primärpartikelindex PPI und die

Position der SPR-Peaks herangezogen. (Abbildung 37 A und D) Bei der Verwendung von Natriumchlorid ist hinsichtlich des PPI ab 0,05 mol/L NaCl ein konstanter Verlauf bei einem Wert von ~ 22 in Abhängigkeit der Salzkonzentration zu verzeichnen. Anhand des SPR-Peaks ist ebenfalls kein signifikanter Trend zu erkennen, die Werte liegen hier zwischen 521 nm und 522,5 nm. Dies widerspricht der Erwartung, dass der SPR-Peak sich mit erhöhter Oberflächenbeladung verschiebt. [69, 70, 71] Auf diesen Punkt wird jedoch im weiteren Verlauf der Arbeit näher eingegangen. Im Vergleich zu der Verwendung von NaCl bei der Oligonukleotid-Konjugation weisen die Konjugate, welche mit NaPP hergestellt wurden, keine signifikanten Unterschiede auf.

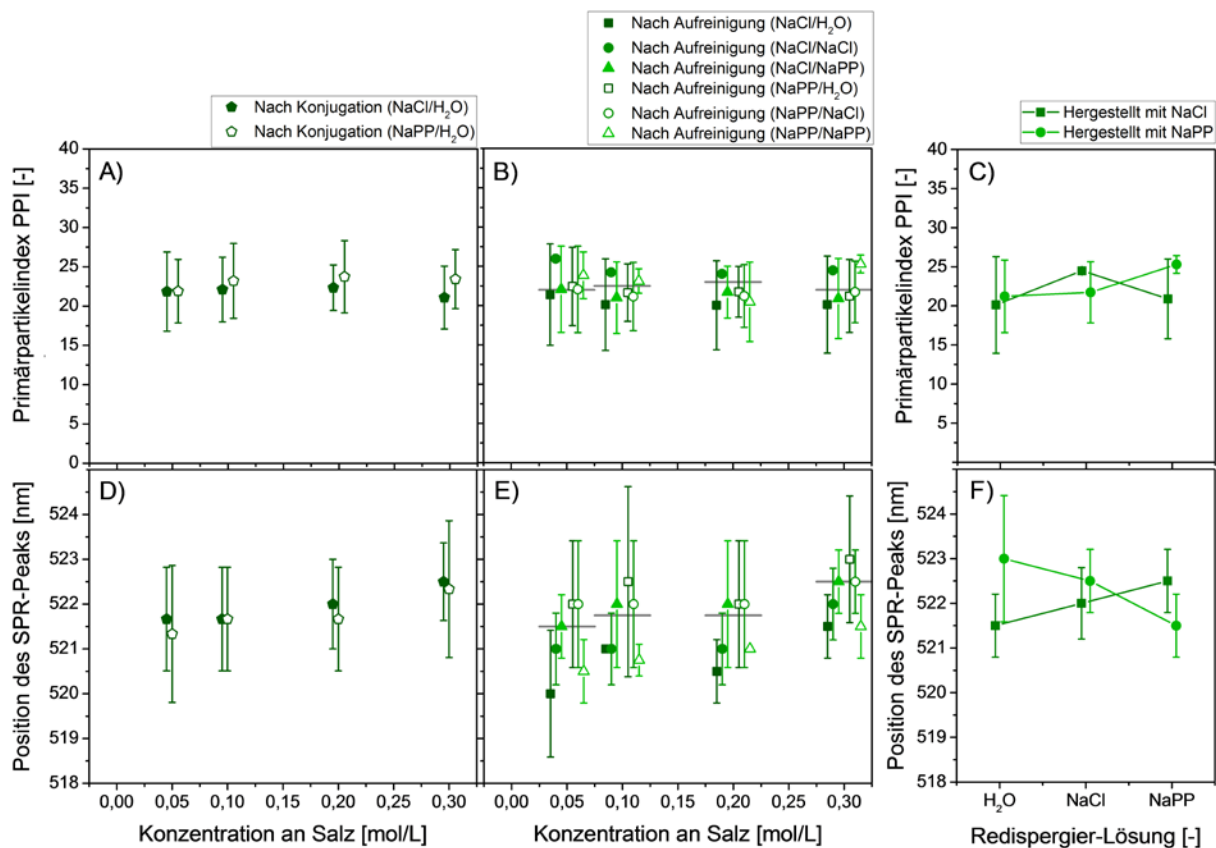


Abbildung 37: Stabilität der AuNP-Oligonukleotid-Konjugate. Darstellung des Primärpartikelindex (A, B, C) und der Position des SPR-Peaks (D, E, F) für Konjugate aus 5'DNA_{CT26T10} (1,3 μM) in Abhängigkeit der NaCl- und NaPP-Konzentration vor und nach der Aufreinigung mittels Ultrazentrifugation. Für 0,3 M NaCl und NaPP ist ein Auszug des PPI und der Position des SPR-Peaks in Abhängigkeit der Redispergier-Lösung aufgetragen. (C, F) Die eingesetzte Oligonukleotid-Konzentration beträgt 1,3 μM.

Nach der Aufreinigung wurden die Konjugate jeweils in MilliQ-Wasser, Natriumchlorid und Natriumphosphatpuffer redispergiert. (Abbildung 37 B und E) Die Konzentrationen der Salz-Lösungen waren hierbei die gleichen wie die, die zur Konjugation verwendet wurden. Sowohl bei den Proben, welche mit NaCl, als auch bei denen, welche mit NaPP konjugiert wurden, ist keine Veränderung des PPI unter Berücksichtigung der Standardabweichung zu erkennen.

Weiterhin sind Tendenzen zu verzeichnen, welche darauf hindeuten, dass die Verwendung von Natriumchlorid und Natriumphosphatpuffer möglicherweise eine Verbesserung der Stabilität bewirken. (Abbildung 37 C) Diese Tendenz kann durch die Auswertung des SPR-Peaks für die Verwendung von NaPP bestätigt werden. Hierbei ist eine Abnahme von bis zu -2 nm zu erkennen. Bei der Verwendung von NaCl während der Konjugation tritt der gegenteilige Effekt auf. (Vgl. Abbildung 37 F)

Eine mögliche Erklärung kann über die Abschirmung der negativen Ladungen im System durch die Na^+ -Ionen erfolgen. Die positiven Na^+ -Ionen im System schirmen während der Oligonukleotid-Konjugation die negativen Ladungen der Nanopartikel und der Liganden ab, sodass die Abstoßung der Teilchen verringert wird. Durch diese Methode wird die Anbindung der Oligonukleotide unterstützt. [16, 97] Werden die Partikel nach der Aufreinigung mit MilliQ-Wasser redispergiert, so wird die Menge der positiven Gegenionen verdünnt und möglicherweise aus dem Konjugat gespült. Dadurch erhöht sich die Abstoßung der Liganden auf der Oberfläche und es ist denkbar, dass diese sich vermehrt aufstellen sowie eine verbesserte Stabilität der Konjugate mit größeren Interpartikelabständen bewirken. Dies kann durch den Einsatz von NaCl oder NaPP bei dem Redispergieren verhindert werden. Hierbei wird entweder die gleiche Menge an Na^+ -Ionen (NaCl) oder mehr (NaPP) zu dem Konjugat gegeben, wodurch die Abschirmung aufrechterhalten oder verstärkt wird.

Bei der Verwendung von NaPP sind mehr Na^+ -Ionen in der Probe, da sowohl NaH_2PO_4 als auch Na_2HPO_4 für die Herstellung des Puffers eingesetzt wurde. Die Differenz der Na^+ -Konzentration zwischen NaCl und NaPP steigt mit steigender Salz-Konzentration und beträgt bei 0,3 mol/L Salz 107 mM.²⁴ (Anhang: Abbildung 150)

Wird bereits bei der Konjugation NaPP eingesetzt und die Konjugate mit MilliQ-Wasser und NaCl redispergiert, führt dies zu vernachlässigbar kleineren PPI-Werten und einer SPR-Verschiebung von bis zu 2 nm. Hierbei ist anzunehmen, dass durch die Zugabe der Chlorid-Ionen die hydrophoben Wechselwirkungen in der Lösung gestört werden. [193] Dadurch kann eine geringfügige Reduktion der stabilisierenden Abstoßungskräfte auftreten. Auch sind aufgrund der Salze Unterschiede in der Konformation denkbar, die die Konjugateigenschaften beeinflussen.

²⁴ Die Werte der Kationen-Konzentration für die beiden verwendeten Salze sind im Anhang in Abbildung 150 zusammengefasst.

Aufgrund der Tatsache, dass bei dem Redispergieren mit NaPP nach der Konjugation mit NaCl dieser Effekt der Destabilisierung ebenfalls auftritt, kommt eine mögliche Agglomeration aufgrund von einem Ladungsausgleich bei der erhöhten Menge an Na⁺-Ionen ebenfalls in Betracht.

Eine genaue Erklärung anhand der Anionen kann zu diesem Zeitpunkt nicht getätigt werden. Für eine eindeutige Erklärung und eine Verifizierung der auftretenden Effekte von Anionen und Kationen auf den Funktionalisierungsmechanismus von Oligonukleotiden auf Goldnanopartikel müssten unabhängige Untersuchungen zu diesen Spezies getätigt werden.

Der Hauptgrund für die Verwendung von Salzen während der Oligonukleotid-Konjugation von Nanopartikeln ist die Verbesserung der Funktionalisierungsreaktion. Im Folgenden soll dies anhand der Oberflächenbedeckung eingestuft werden. (Die Kalibration befindet sich im Anhang, Kapitel 7.8.1) Abbildung 38 zeigt, dass der Belegungsgrad an DNA-Liganden auf 5 nm Goldnanopartikeln unter Verwendung von NaPP in einem Konzentrationsbereich von 0,05 M bis 0,3 M konstant bei etwa 18 Liganden pro Nanopartikel liegt. Die Konjugationseffizienz liegt hier bei 67 bis 73%. Wird Natriumchlorid während der Salzalterung eingesetzt, steigt die Oberflächenbelegung mit steigender Salzkonzentration von 20±5 bis 27±6 Liganden pro Nanopartikel an. Die Konjugationseffizienz liegt hierbei zwischen 68% und 82%.

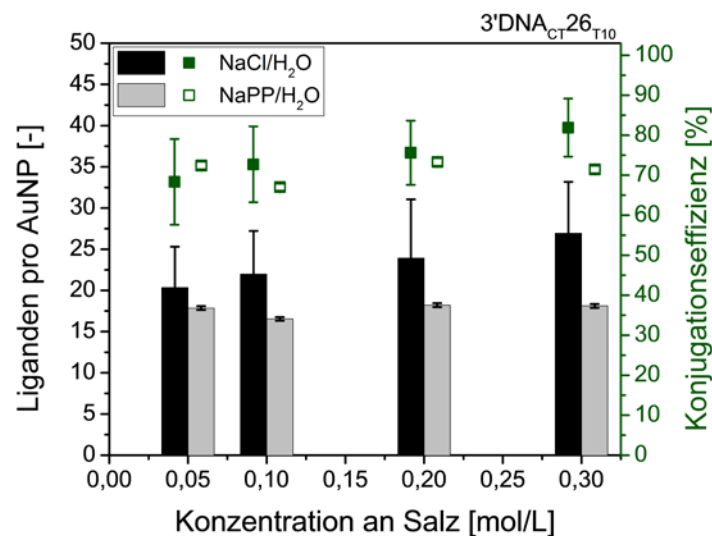


Abbildung 38: Oberflächenbedeckung der AuNP-Oligonukleotid-Konjugate. Darstellung der Anzahl gebundener Liganden pro Goldnanopartikel (links, Balken) und der Konjugationseffizienz (rechts, Punkte) für Konjugate mit 5'DNA_{CT26T10} (1,3 µM) in Abhängigkeit der NaCl- und NaPP-Konzentration nach der Aufreinigung mittels Ultrazentrifugation.

Dieser Prozess wurde bereits durch S. Hurst et al. beschrieben, wobei hier jedoch eine Belegung von etwa 80 Liganden pro 15 nm AuNP beschrieben wurde. [16] Auf 5 nm Partikel konnte mit einem vergleichbaren Oligonukleotid eine ähnliche Belegung von 74,8 Liganden/AuNP durch *In-situ*-Konjugation erreicht werden. Die Konjugationseffizienz bei diesem Experiment liegt jedoch mit bis zu 90% [15] in der gleichen Größenordnung wie die bestimmte Effizienz der hier diskutierten Experimente. Bei der Verwendung der gleichen Konzentration an Natriumphosphatpuffer ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$) sind bis zu 107 mM (Anhang: Abbildung 150 B) mehr Na^+ -Ionen in der Probe als bei NaCl, welche sich der Theorie nach an die negativ geladenen DNA-Stränge und in die diffuse Gegenionen-Schicht der Goldnanopartikel anlagern und somit zu einer erhöhten Oberflächenbedeckung führen sollte. [16] Dies ist jedoch in diesem Experiment nicht der Fall. Daher muss die Erklärung hierfür bei den jeweiligen Anionen liegen.

Die Anionen H_2PO_4^- und Cl^- gehören der Hofmeister-Reihe an und werden in kosmotrope und chaotrope Anionen eingeordnet. [190, 193] Allerdings stellt der bereits vorgestellte Effekt der Hydratisierbarkeit in diesem Zusammenhang keinen signifikanten Einfluss dar. Im Folgenden wird dies erklärt. Während das Chlorid-Ion mit einem Ionendurchmesser von 0,34 nm [192] klein und schwächer hydratisiert ist, besitzt das H_2PO_4^- -Ion hingegen einen Ionendurchmesser von 0,42 nm [192] und ist somit um fast ein Viertel größer als das Chlorid. Anionen mit einer schwächeren Hydratisierung lagern sich besser an die Partikeloberfläche an, wodurch die Abschirmung der Partikel zu den Oligonukleotiden verringert werden würde und damit auch die Oberflächenbeladung reduziert wäre. Weiterhin ist in diesem Fall die Oberfläche durch Phosphat-Anionen aus dem Herstellungsprozess der Partikel (Kapitel 4.1) bereits belegt, sodass zunächst ein Austausch der Anionen erfolgen müsste.

Ein weiterer Aspekt ist der Einfluss der Anionen auf die hydrophoben Effekte in der Lösung. Im Gegensatz zu kosmotropen Anionen wie das H_2PO_4^- reduzieren chaotrope Anionen wie das Cl^- -Ion die hydrophoben Wechselwirkungen in der Lösung, stören das Netzwerk aus Wasserstoff-Brückenbindungen [193] und können schließlich zu einer Veränderung der Oligonukleotid-Struktur führen. Dadurch wird die Abstoßung der Liganden zueinander und zu der Partikeloberfläche stärker reduziert und die

Oberflächenbeladung kann zunehmen. Darüber hinaus scheint dieser Effekt signifikanter zu sein als die Menge an Na^+ -Ionen und die Wechselwirkungen der Anionen mit der Partikeloberfläche.

Aus der vorhergehenden Analyse kann zusammengefasst werden, dass der Einsatz von Salzlösungen essentiell ist für die erfolgreiche Funktionalisierung von Goldnanopartikeln mit stark negativ geladenen Liganden wie Oligonukleotiden. Im Allgemeinen können jegliche Art von Kationen eingesetzt werden, jedoch sind solche Verbindungen wie beispielsweise NaCl , welche aus Ionen mit kleinen Durchmessern und schwach polarisierbaren Anionen bestehen, zu bevorzugen. Weiterhin wird anhand der gezeigten Experimente eine Inkubationszeit von 24 Stunden empfohlen, wenn auch eine kürzere Dauer möglich wäre. Dies wurde jedoch nicht experimentell geprüft. Ein negativer Einfluss der untersuchten Faktoren konnte nicht gefunden werden.

Variation der einzusetzenden Menge an Liganden

Nach der Untersuchung der grundlegenden Konjugationsparameter soll die Funktionalisierung bei variierender Initialkonzentration analysiert werden. Abbildung 39 A zeigt die ermittelte Anzahl an Liganden pro Goldnanopartikel bei verschiedenen eingesetzten Liganden zwischen 30 und 300 DNA/AuNP. Auch hier ist zu erkennen, dass die Oberflächenbelegung mit steigender Salzkonzentration erhöht wird. Die Erhöhung der Oberflächenbedeckung verläuft bei allen eingesetzten NaCl -Konzentrationen zwischen 0,01 und 0,5 mol/L gleich. (Die Kalibration befindet sich im Anhang, Kapitel 7.8.1)

Erwartungsgemäß steigt die absolute Anzahl an Liganden pro Goldnanopartikel mit der eingesetzten Initialkonzentration an. So wird für das Oligonukleotid 5'DNA_{CT26T10} eine maximale Oberflächenbedeckung von $168,0 \pm 2,2$ Liganden/AuNP ermittelt. Dies entspricht einem minimalen Footprint von $0,47 \text{ nm}^2$. Im Vergleich zu dem negativen Peptid CE_{12W} (Kapitel 4.2.3; Aufreinigung durch Ultrazentrifugation) ist hierbei der Footprint um $0,17 \text{ nm}^2$ kleiner und deutet somit auf eine dichtere Packung der Oligonukleotide auf den Nanopartikeln. Der Grund hierfür kann in der Struktur der Liganden oder der Konjugationsmethode liegen. Die DNA ist etwa 4,4-mal so groß wie das CE_{12W}-Peptid, was auch für eine größere Oberflächenbeladung des Peptids

sprechen würde. Allerdings stellen beide Liganden in einem vollständig geladenen Zustand eine gestreckte Konformation dar, was durch bestimmte Faktoren wie pH-Wert und Elektrolytkonzentrationen beeinflusst werden kann. Bei der Konjugation von Oligonukleotiden auf Goldnanopartikel wird ein Salzalterungsprozess eingesetzt, um die Ladungen abzuschirmen und somit eine höhere Oberflächenbeladung zu erreichen. Dies wurde bei dem negativ geladenen Peptid nicht eingesetzt, was jedoch auch hier zu einer höheren Ligandendichte führen könnte.

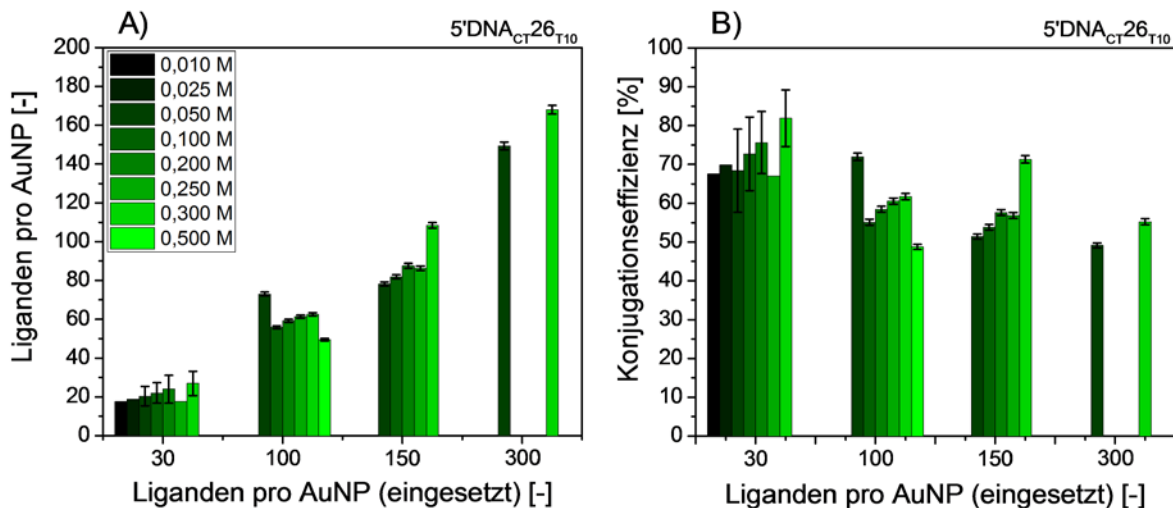


Abbildung 39: Oberflächenbedeckung der AuNP-Oligonukleotid-Konjugate. Darstellung der Anzahl gebundener Liganden pro Goldnanopartikel (A) und der Konjugationseffizienz (B) für Konjugate aus 5'DNA_{CT26T10} in Abhängigkeit der eingesetzten Menge an Liganden pro AuNP nach der Aufreinigung mittels Ultrazentrifugation für NaCl-Konzentrationen zwischen 0,01 und 0,5 mol/L.

Die Werte für die Oberflächenbedeckung steigen in dem betrachteten Konzentrationsbereich der DNA-Liganden durchgehend an. Daher ist zu vermuten, dass eine zu erwartende Sättigung erst bei höheren Konzentrationen erreicht wird. Anhand einer exponentiellen Angleichung für die Datenreihen mit 0,05 M und 0,3 M NaCl konnte ein Sättigungswert von 228 DNA/AuNP ermittelt werden. (Anhang: Tabelle 23) Dies würde einem theoretischen Footprint von 0,34 nm² entsprechen, welcher um 0,13 nm² kleiner ist als der von CE_{12W}.

Die Bestimmung der Adsorptionsisothermen hat ergeben, dass auch hierbei die Konjugation der Oligonukleotide auf Goldnanopartikeln durch die Freundlich-Isotherme beschrieben werden kann. (Anhang: Tabelle 23) Hingegen wurden bei der Konjugation des negativen Peptids CE_{12W} n-Werte von mindestens 1,5 ermittelt, dies deutet auf eine physikalische Adsorption. In diesem Experiment wurden n-Werte von 1,0 bis 1,16 ermittelt. Dies führt zu der Schlussfolgerung, dass die Adsorption

außerdem durch die lineare Henry-Isotherme beschrieben werden kann und mit Konzentrationen unterhalb der Sättigungskonzentration gearbeitet wurde. [153]

Bei einer Konjugationseffizienz von 5'DNA_{CT26T10} ist der Anstieg mit der Salzkonzentration zu erkennen. Weiterhin nimmt die Konjugationseffizienz erwartungsgemäß mit der Initialkonzentration ab. Hierbei nehmen die Werte von etwa 81% auf 55% ab und weisen schließlich maximale Konjugationseffizienzen von 48% (0,05 mol/L NaCl) und 55% (0,30 mol/L NaCl) auf. Bei der absoluten Anzahl an Liganden pro Nanopartikel liegt basierend auf der exponentiellen Anpassung (Anhang: Abbildung 149) in dem Sättigungswert der beiden Salzkonzentrationen eine Differenz von 44 Liganden vor, jedoch liegen die Werte der maximalen Konjugationseffizienz mit 7% nicht dementsprechend weit auseinander. Dies deutet darauf hin, dass die Konjugationseffizienz bei hohen Initialkonzentrationen unabhängig von der Salzkonzentration angegeben werden kann.

Die hierbei bestimmten Werte der Konjugationseffizienz weisen den gleichen Verlauf auf wie bereits in der Literatur beschrieben wurde. [15] Die minimale Effizienz bei 300 eingesetzten Liganden pro Nanopartikel ist in etwa doppelt so hoch, wie die in der Literatur Beschriebene, welche ebenfalls auf ligandenfreien Nanopartikeln bestimmt wurde. [15] Unterschiede können hierbei aufgrund der Länge der Sequenz (5'CTA CCT GCA CTG TAA GCA CTT TG3'), welche 23 Basen enthält, und des Thymin-Spacers mit zusätzlichen 10 Basen in der hier verwendeten Sequenz zustande kommen. Auf diese Aspekte soll im weiteren Verlauf der Arbeit eingegangen werden.

Vergleich verschiedener Sequenzen

Die bisherigen Experimente erfolgten an der DNA-Sequenz 5'DNA_{CT26T10}. Im Folgenden soll diese Sequenz mit zwei längeren DNA-Sequenzen und drei ebenfalls unterschiedlich langen LNA-Sequenzen verglichen werden. Bezogen auf die Länge der Sequenzen ist zu erwarten, dass die Oberflächenbelegung mit steigender Sequenzlänge sinkt [33], da mit steigender Basenzahl die negative Ladung der Liganden stärker wird und somit mehr Gegenionen zur Abschirmung der Ladungen notwendig sind. Im Fall der DNA-Liganden steigt außerdem die Flexibilität der Liganden und damit das Zusammenfallen der Sequenzen, dies hat einen erhöhten Platzbedarf zur Folge. [33]

Die Ergebnisse bestätigen dies jedoch nur für die Verwendung von LNA-Oligonukleotiden. (Abbildung 40 A) Die Anzahl gebundener Liganden bei den LNA-Konjugaten sinkt mit steigender Sequenzlänge bis auf eine Ausnahme bei 0,5 M NaCl. Bei den DNA-Sequenzen (Abbildung 40 B) ist keine eindeutige Abhängigkeit der Oberflächenbedeckung von der Anzahl der eingesetzten Basen zu erkennen. (Die Kalibrationen befinden sich im Anhang, Kapitel 7.8.1) Dies wird im weiteren Verlauf der Ergebnisdarstellung näher erläutert. Ein weiterer Aspekt ist der signifikante Unterschied in der Beladung zwischen den DNA- und LNA-Konjugaten.

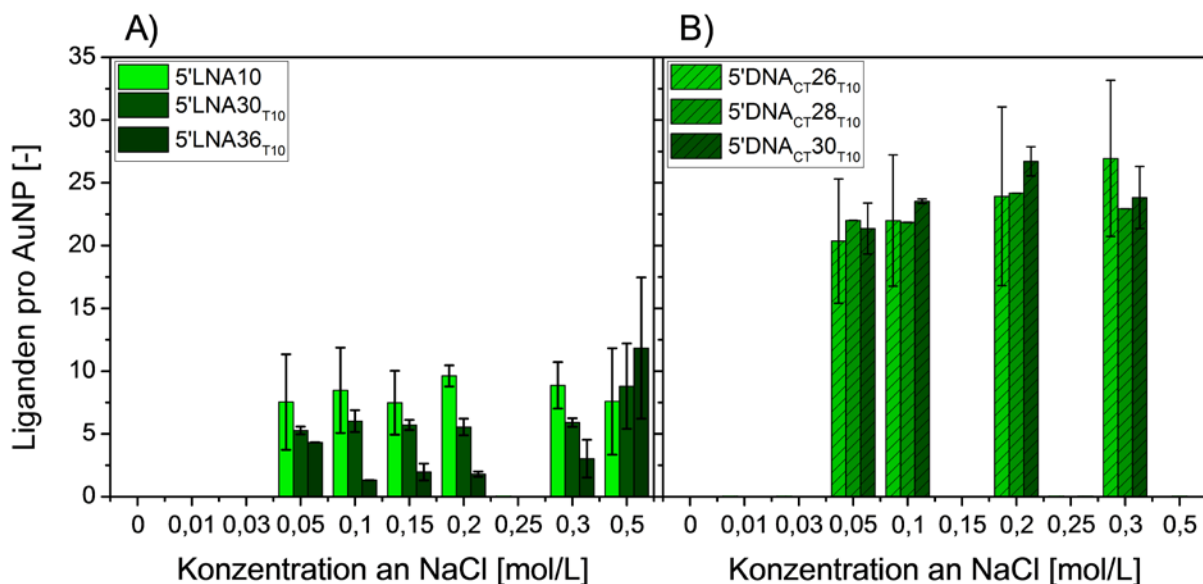


Abbildung 40: Vergleich von LNA und DNA-Liganden bei der Funktionalisierung von Goldnanopartikeln. Darstellung der Anzahl gebundener Liganden pro Goldnanopartikel für LNA-Oligonukleotide (A) und DNA-Oligonukleotide (B) unterschiedlicher Länge in Abhängigkeit der eingesetzten Menge an NaCl. Die LNA-Konjugate wurden hierbei mit 0,7 μ M LNA hergestellt, die DNA-Konjugate wurden hingegen mit 1,3 μ M hergestellt.

Anhand der Konjugationsreihe mit 0,3 mol/L NaCl soll näher untersucht werden, welche unterschiedlichen Effekte bei der Konjugation mit LNA- und DNA-Oligonukleotiden auftreten können. (Abbildung 41 A) Wie bereits erwähnt, ist bei den LNA-Sequenzen eine deutliche Reduktion der Oberflächenbeladung von $8,9 \pm 1,9$ (10 Basen) auf $3,0 \pm 1,5$ (36 Basen) LNA/AuNP zu erkennen (-66%). Bei einer Differenz von sechs Basen (30 und 36 Basen) tritt bereits eine Reduktion der Oberflächenbeladung von -49% auf. Bei der Verwendung von DNA-Oligonukleotiden ist die Reduktion geringer (-12%) und sinkt von $27,0 \pm 6,2$ (26 Basen) auf $23,8 \pm 2,5$ (30 Basen) DNA/AuNP. Das entspricht einem Unterschied von 5,2% pro Base. Insgesamt binden jedoch mehr DNA-Liganden an Goldnanopartikel als LNA-Liganden. Das unterschiedliche Verhalten dieser beiden Oligonukleotid-Spezies kann auf die Struktur der Sequenzen zurückzuführen sein.

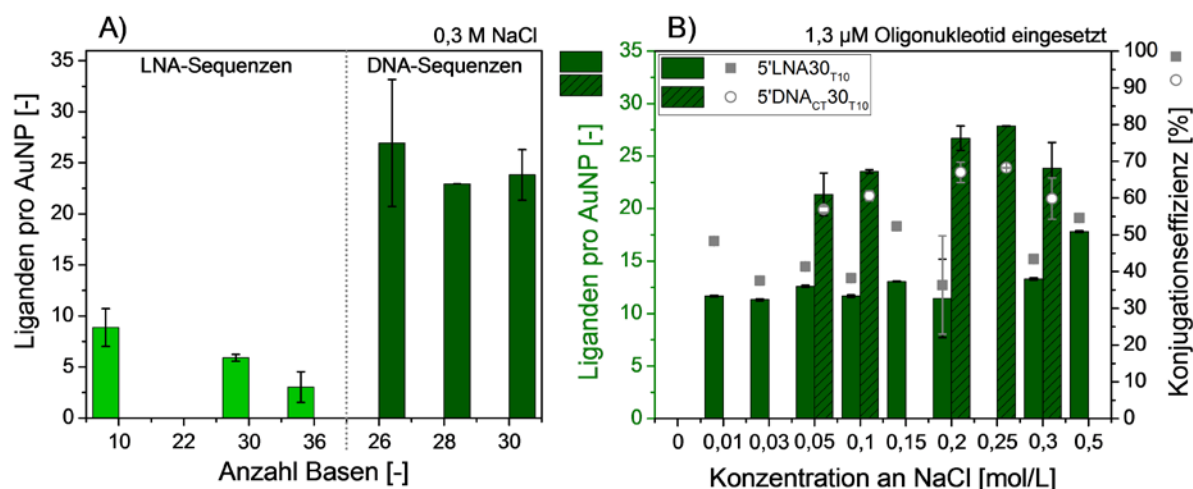


Abbildung 41: Vergleich von LNA- und DNA-Liganden bei der Funktionalisierung von Goldnanopartikeln. Darstellung der maximalen Ligandenbelegung in Abhängigkeit der Anzahl an Basen. Die LNA-Konjugate wurden hierbei mit 0,7 μM LNA hergestellt, die DNA-Konjugate wurden hingegen mit 1,3 μM hergestellt. (A) Darstellung der Oberflächenbelegung (links, Balken) und der Konjugationseffizienz (rechts, Punkte) von DNA- und LNA-Konjugaten mit einer Sequenzlänge von 30 Basen in Abhängigkeit der eingesetzten Menge an NaCl. (B)

Bei beiden Oligonukleotid-Typen sind bei längeren Sequenzen mehr Gegenionen notwendig, um die gleiche Oberflächenbeladung zu erreichen als bei kürzeren Sequenzen. Der Grund hierfür ist, dass bei längeren Sequenzen mehr negative Ladungen vorhanden sind, die abgeschirmt werden müssen.

Die Reduktion der Oberflächenbeladung in Abhängigkeit der Sequenzlänge wurde bereits für DNA-Oligonukleotide beschrieben. Längere Sequenzen mit beispielsweise 28 Basen und mehr haben eine erhöhte Flexibilität und können sich zusammenknäulen und sich dadurch auf die Nanopartikel legen. Durch diesen Effekt wird die Partikeloberfläche für weitere Liganden blockiert. [33] Der Unterschied bei den DNA-Sequenzen ist jedoch geringer ausgeprägt als bei den LNA-Sequenzen. Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass der Größenunterschied aufgrund des Zusammenknäulens reduziert wird. Es ist zu vermuten, dass in dem vorliegenden Fall die eingesetzten Konzentrationen zu gering sind, um Unterschiede zu erkennen. Für diesen Zweck müssten die DNA-Liganden sich aufstellen, was bei höheren Oberflächenbeladungen auftritt. Demnach wird möglicherweise erst bei Bedeckungsgraden nahe der Oberflächensättigung ein deutlicher Unterschied zwischen den Sequenzlängen deutlich.

Der direkte Vergleich einer Sequenz als LNA- und DNA-Oligonukleotid, welche bei gleichen Bedingungen an 5 nm Goldnanopartikel konjugiert wurde, ist in Abbildung 41 B dargestellt. Es treten bei gleicher Salzkonzentration und gleicher

Initialkonzentration der Liganden von 1,3 μM Unterschiede in der Belegung von bis zu 15,3 Liganden pro Nanopartikel auf. Das beträgt in 7 von 8 Proben mehr als 100% der LNA-Belegung. Dies hat zur Folge, dass sich auch der Platzbedarf der Liganden auf den Goldnanopartikeln in dem gleichen Maß unterscheidet. Der Footprint für 5'LNA_{30T10} beträgt bei diesem System $5,9 \pm 0,04 \text{ nm}^2$ ($13,3 \pm 0,1$ Liganden/AuNP) und der Footprint für 5'DNA_{CT30T10} beträgt $3,3 \pm 0,34 \text{ nm}^2$ ($23,8 \pm 2,5$ Liganden/AuNP). (Anhang: Abbildung 161) Hieraus wird erneut deutlich, dass bei der Konjugation von DNA-Oligonukleotiden eine doppelt so hohe Oberflächenbelegung erreicht werden kann wie bei der Konjugation mit LNA-Oligonukleotiden. Dieser Unterschied kann jedoch nicht durch die Literatur bestätigt werden.

Eine Erklärung für dieses Ergebnis kann in der unterschiedlichen Struktur der LNA im Vergleich zu DNA liegen. Die LNA-Sequenzen sind in ihrer Struktur starr, da in den Ribose-Bausteinen eine Verbrückung eingebaut ist, welche die Flexibilität blockiert. [132, 133] Aus diesem Grund liegen die Sequenzen gestreckt vor, wodurch alle negativen Ladungen nach außen orientiert sind. Anders als bei der DNA besteht hierbei nicht die Möglichkeit, dass sich die Liganden zusammenknäulen, wodurch möglicherweise ein Teil der negativen Ladungen auch innerhalb der Oligonukleotid-Faltung liegt und dadurch effektiv nicht abgeschirmt werden müssen.

Die gestreckte Konformation ist zwar vorteilhaft, da somit die Nanopartikeloberfläche nicht für weitere Liganden blockiert wird, für das Erreichen einer maximalen Oberflächenbeladung müssen jedoch möglichst alle vorhandenen Ladungen abgeschirmt werden. Dies führt bei der nach außen gerichteten Anordnung der Ladungen der LNA dazu, dass in gestreckter Konformation mehr Gegenionen, also eine erhöhte NaCl-Konzentration, für eine hohe Oberflächenbeladung erforderlich sind und dadurch bei gleichen Bedingungen eine geringere LNA-Beladung erreicht wird.

D. Seferos et al. hat bei dem Vergleich dieser Oligonukleotid-Typen ähnliche Beladungen von 205 ± 18 und 192 ± 8 Liganden/AuNP ermittelt. [134] Hierbei wurden 13 nm Goldnanopartikel verwendet, deren Oberfläche 6,7-mal so groß ist wie die eines 5 nm Goldnanopartikels. Durch Umrechnen der Beladung auf die Oberfläche wird eine der hierzu ähnlichen DNA-Beladung von ~ 30 Liganden/NP erreicht. Der Grund dafür, dass bei den hier vorliegenden Ergebnissen Unterschiede zwischen LNA und DNA gefunden wurden, kann an der Position der HS-Gruppe liegen. Die in dieser Arbeit zur

Untersuchung des Ligandeneinflusses verwendeten Sequenzen wurden ausschließlich am 5'-Ende der Sequenz thiolisiert.

Hierbei entsprechen alle Sequenzen mit HS-Gruppe der vollständigen Länge, da die Synthese der Sequenzen vom 3'- zum 5'-Ende erfolgt und dadurch nur bei vollständigen Sequenzen eine Bindung der Thiol-Gruppe an die Sequenz erfolgen kann. Wird die Thiol-Gruppe am 3'-Ende der Sequenz gebunden, wie es in der Literatur beschrieben ist, so können auch viele kürzere Fragmente eine Thiol-Gruppe haben. Der Grund ist, dass die Synthese der Sequenz oftmals nicht vollständig erfolgt. Die kürzeren Oligonukleotid-Stränge binden an den Partikeln und führen aufgrund ihrer veränderten Konformation und einer geringeren negativen Ladung zu einer höheren Beladung. [33] Dies resultiert folglich im Zusammenhang mit der vorteilhaften gestreckten Konformation der LNA-Liganden in einer ähnlich hohen Beladung der LNA- und DNA-Liganden.

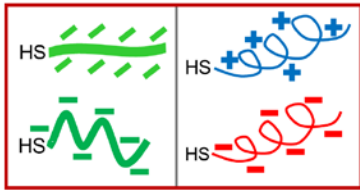
Bei der Konjugationseffizienz treten Unterschiede von bis zu 30,7% auf. Es fällt auf, dass erst ab 0,5 mol/L NaCl ein Anstieg der Oberflächenbelegung an LNA in Abhängigkeit der Salzkonzentration auftritt. Dies deutet darauf hin, dass für ein LNA-Oligonukleotid mit 30 Basen mindestens diese Menge an Gegenionen nötig ist, um die Erhöhung der Belegung zu erreichen. Eine geringere Menge ist nicht ausreichend, um die starren und dadurch auch stärker negativ geladenen Stränge ebenso gut wie die DNA-Sequenzen abzuschirmen und somit eine vergleichbare Oberflächenbeladung zu erreichen.

Anhand des SPR-Peaks und des Primärpartikelindex (Anhang: Abbildung 166, 169, 172, 176) wird jedoch deutlich, dass die LNA-Sequenzen bereits bei geringerer Belegung eine gute Stabilität der Nanopartikel bewirken und somit keinen Nachteil, wie beispielsweise eine Agglomeration, haben. Dies unterstützt die Theorie, dass die Ladung der LNA-Liganden nach außen gerichtet ist. Dies ist von Vorteil, da eine geringere Belegung bei gleicher Stabilität Platz auf den Partikeln lässt für die Anbindung weiterer Funktionsliganden [10] und bietet somit die Möglichkeit der Synthese von multifunktionalen Systemen für biologische Anwendungen. Weiterhin ist eine geringe Belegung erwünscht, weil somit die Liganden Platz haben, um an ihrem Zielort zu binden und somit ihre Funktion effektiver ausüben können.

Bei der Untersuchung von Goldnanopartikel-Oligonukleotid-Konjugaten konnte zunächst ermittelt werden, dass eine Inkubationszeit von maximal 24 Stunden ausreichend ist für eine effiziente Anbindung der Liganden. Weiterhin werden für die zur Konjugation notwendigen Salzlösungen diejenigen Salze empfohlen, welche aus schwach polarisierbaren und kleinen Anionen wie Chlorid bestehen. Bei der Wahl der Initialkonzentration der Liganden sollte die Konjugationseffizienz, welche exponentiell mit steigender Konzentration sinkt, berücksichtigt werden. Es sollte eine Effizienz von mindestens 50% gewählt werden. Es konnten bei diesen Experimenten maximale Oberflächenbelegungen von $168,0 \pm 2,2$ Liganden/AuNP ermittelt werden. Bei dem Vergleich zwischen DNA und LNA, ebenso bei der unterschiedlichen Anzahl an Basen, ist zu erkennen, dass LNA-Oligonukleotide mit 5'-Thiol schwieriger an die Partikel zu binden sind. Die Verlängerung der Sequenzen hat den gleichen Effekt, dieser ist bei der Verwendung von LNA-Oligonukleotiden jedoch ausgeprägter. Trotz der schlechteren Konjugationsfähigkeit der LNA sind die resultierenden Konjugate jedoch ebenso stabil wie AuNP-DNA-Konjugate.²⁵

²⁵ Weitere Ergebnisse sind ergänzend in Kapitel 7.8.6. im Anhang zu finden.

4.2.5. Einfluss von Peptiden auf Goldnanopartikel-Oligonukleotid-Konjugaten



In den vorhergehenden Kapiteln wurden lediglich monofunktionale Konjugate betrachtet. Nun soll der Einfluss eines zweiten Liganden auf das Konjugat untersucht werden. In diesem Kapitel liegt der Schwerpunkt auf der Bildung eines bifunktionalen Konjugats aus Oligonukleotiden und Peptiden. Es wurden in diesen Experimenten ausschließlich thiolisierte Liganden eingesetzt. Hierbei wurde zunächst der Einfluss eines dreifach positiv geladenen NLS_{Cys}-Peptids (14 Aminosäuren) auf das resultierende Konjugat untersucht und anschließend mit einem hydrophilen Deca-Arginin (CWR₁₀) und einem hydrophoben Peptid (CWKLPVM) verglichen.

Zunächst soll die Oberflächenbelegung untersucht werden. (Die Kalibrationen befinden sich im Anhang, Kapitel 7.8.1) Die bisher hergestellten und untersuchten Oligonukleotid-Konjugate wurden intendiert mit untersättigten Initialkonzentrationen des Liganden hergestellt. Aufgrund der Tatsache, dass bei dieser Herangehensweise die resultierenden Konjugate stabil sind, soll zunächst untersucht werden, welche Menge eines zweiten Liganden auf den Nanopartikeln gebunden werden kann. Dies soll anhand verschiedener Belegungen in Abhängigkeit der Sequenzlänge (Abbildung 42 A) erfolgen. Die Peptidkonjugation erfolgte erst nach Aufreinigung der AuNP-Oligonukleotid-Konjugate.

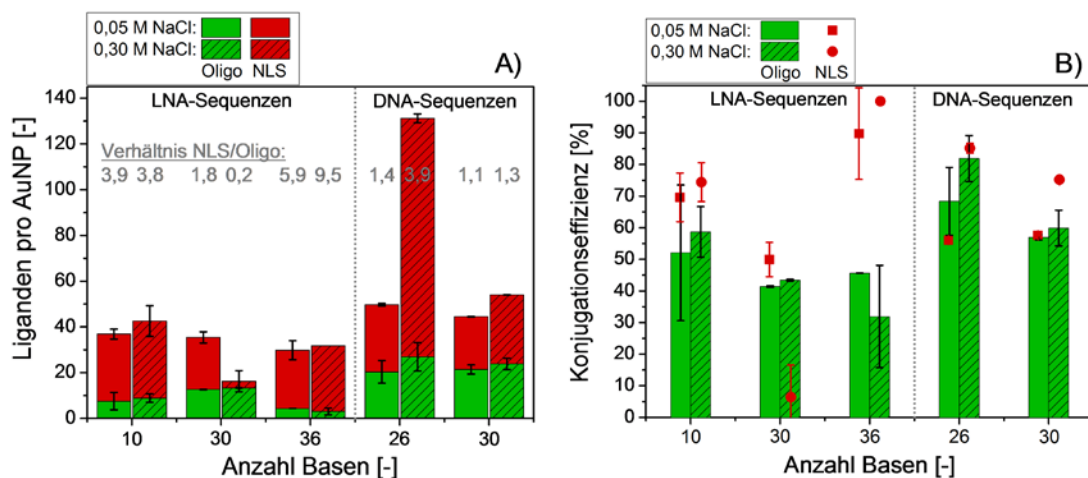


Abbildung 42: Oberflächenbelegung von bifunktionalen Konjugaten. Darstellung der Ligandenbelegung an Oligonukleotid und NLS_{Cys}-Peptid in Abhängigkeit der Anzahl an Basenpaaren für bifunktionale AuNP-Oligonukleotid-NLS_{Cys}-Konjugate. (A) Darstellung der Konjugationseffizienz von Oligonukleotiden und NLS_{Cys}-Peptid in Abhängigkeit der Anzahl an Basenpaaren für bifunktionale AuNP-Oligonukleotid-NLS_{Cys}-Konjugate. (B) Die Initialkonzentration der Oligonukleotide beträgt 0,7 μ M und 1,3 μ M. Bei dem NLS_{Cys}-Peptid wurde 2 μ M eingesetzt.

An den Ergebnissen der Oberflächenbedeckung für das NLS_{Cys}-Peptid auf verschiedene AuNP-Oligonukleotid-Konjugate ist zu erkennen, dass sowohl bei den DNA- als auch bei den LNA-Konjugaten mehr Peptid-Liganden als LNA-Liganden an den Partikeln binden. Dies wird insbesondere deutlich, wenn ähnliche Initialkonzentrationen eingesetzt werden. Die Verhältnisse der gebundenen Liganden liegen hierbei bis zu einem Vielfachen an NLS_{Cys} von 9,5 (36 Basen, 0,3 M NaCl). Es ist jedoch keine eindeutige Tendenz zu erkennen. Bei zwei von fünf Proben sind die Verhältnisse für die beiden ausgewählten NaCl-Konzentrationen gleich. Der Grund für die hohe Peptid-Beladung ist zum einen der freie Platz, der nach der Oligonukleotid-Konjugation noch auf den Partikeln für weitere Funktionalisierungen zur Verfügung steht. [10] Zum anderen besteht vermutlich eine elektrostatische Anziehung zwischen den Reaktionspartnern, da das Peptid in dem verwendeten pH-Bereich eine Nettoladung von +3 trägt und die Konjugate negativ geladen sind. [72] Selbst bei dem Einsatz gleicher Initialkonzentrationen der Oligonukleotid- und Peptid-Liganden wird durch die elektrostatische Anziehung eine verstärkte Beladung an Peptid erreicht, insbesondere da es sich bei diesem Verfahren um eine zweistufige *Ex-situ*-Konjugation handelt.

Ein Effekt der zuvor bei der Konjugation verwendeten Salze kann ausgeschlossen werden, weil sie beim Aufreinigen mit dem Überstand entfernt worden sind und die Partikel in MilliQ-Wasser redispersiert worden sind. Die Konjugationseffizienz der NLS_{Cys}-Funktionalisierung beträgt durchschnittlich 50-80% (Anhang: Abbildung 170, 173, 174, 177) und weist in Abhängigkeit der Basenlänge auf keinen eindeutigen Trend hin. (Abbildung 42 B) Jedoch ist darauf hinzuweisen, dass eine reduzierte Oberflächenbeladung an LNA eine erhöhte Konjugationseffizienz an Peptid zur Folge haben könnte. Dies führt zu der Schlussfolgerung, dass diese weiterhin optimiert werden kann. Dies könnte beispielsweise durch ein stärker positiv geladenes Peptid erfolgen oder durch die Verlängerung der Inkubation auf mehr als eine Stunde.

Nachdem die Oberflächenbedeckung betrachtet wurde soll im Folgenden der Einfluss der Anbindung des Peptids auf die Eigenschaften des resultierenden Konjugats analysiert werden. Aufgrund der positiven Ladung des Peptids ergibt sich bei der Konjugation von unstabilierten Nanopartikeln eine Agglomeratbildung, welche zu einem Ausfallen der Partikel führen kann. [72, 82] Die Messung des

hydrodynamischen Durchmessers zur Analyse auftretender Agglomerations-Effekte ist vorteilhaft, weil die Methode der dynamischen Lichtstreuung empfindlich gegenüber der Existenz von großen Partikeln ist. Abbildung 43 A zeigt die Werte dieser Messung für AuNP-5'LNA_{36T10}-Konjugate mit und ohne NLS_{Cys} auf der Oberfläche.

Es ist zu erkennen, dass die Konjugate mit NLS_{Cys}-Peptid größer sind als die ohne Peptid. Die monofunktionalen LNA-Konjugate weisen zunächst einen Durchmesser von $7,0 \pm 1,3$ nm auf, welcher mit der Größe von ligandenfreien Nanopartikeln vergleichbar ist. Dieser steigt in Abhängigkeit der NaCl-Konzentration auf $9,3 \pm 1,1$ nm an. Aufgrund der Tatsache, dass die LNA-Stränge etwa 10,8 nm lang sind [158, 212] und die Erhöhung des Durchmessers nur 2 nm beträgt, ist zu vermuten, dass die LNA-Stränge nicht gestreckt von der Partikeloberfläche ausgerichtet sind. Bezogen auf die geringe Oberflächenbelegung von weniger als 10 Liganden pro Nanopartikel ist es wahrscheinlich, dass die Liganden an dem flexiblen T₁₀-Spacer (10 Basen) abknicken und sich in einem energetisch günstigen Abstand zu der Partikeloberfläche um diese legen. Hierdurch wird der hydrodynamische Durchmesser geringgehalten. [17, 86, 165, 200]

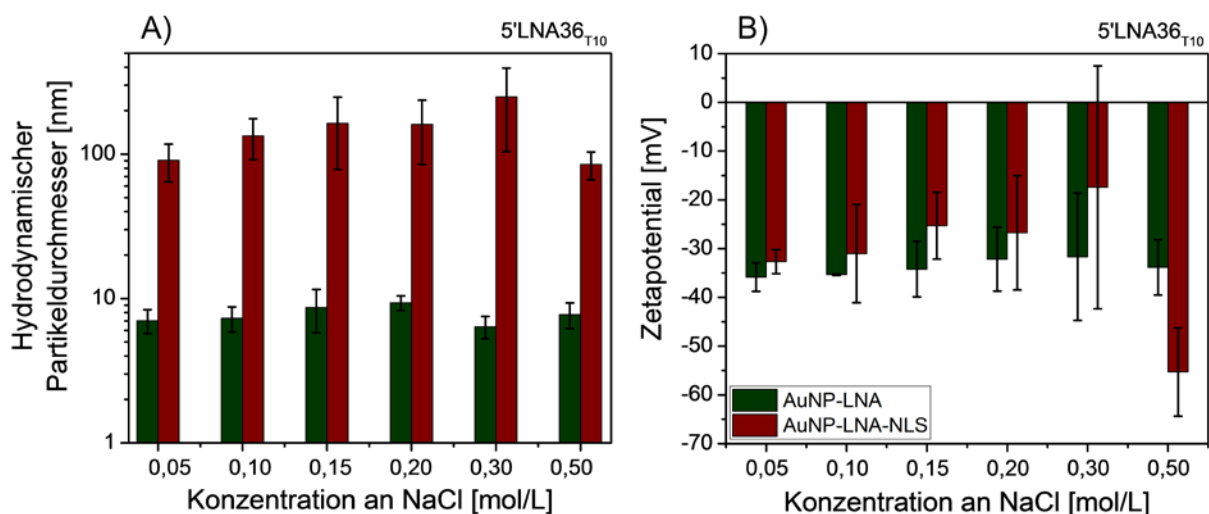


Abbildung 43: Vergleich von monofunktionalen und bifunktionalen Konjugaten mittels Hydrodynamischer Partikeldurchmesser (A) und Zetapotential (B) in Abhängigkeit der bei der Oligonukleotid-Konjugation verwendeten NaCl-Konzentration. Die Initialkonzentration der Oligonukleotide beträgt $0,7 \mu\text{M}$. Bei dem NLS_{Cys}-Peptid wurde $2 \mu\text{M}$ eingesetzt.

Bei der Verwendung des NLS_{Cys}-Peptids hingegen ist ein signifikanter Anstieg des Durchmessers zu verzeichnen. Es liegen Größen zwischen 90 und 250 nm vor. Dieser Anstieg in der Größe deutet auf die Destabilisierung der Partikel mit anschließender Agglomeratbildung hin. Dies kann durch den Primärpartikelindex von 3,0 - 5,5 (Anhang: Abbildung 176) bestätigt werden.

Das Zetapotential der Konjugate bestätigt die Anbindung des Peptids an den Partikeln durch die betragsmäßig reduzierten Werte aufgrund der positiven Ladung des Peptids. (Abbildung 43 B) Die sowohl bei der Größe als auch bei dem Zetapotential auftretende Tendenz zu größeren und betragsmäßig geringer geladenen Partikeln, bei der Peptid-Konjugation zwischen 0,05 M und 0,3 M, ist auf die mit der Salzkonzentration ansteigende Oberflächenbelegung (Abbildung 40) nach der LNA-Konjugation zurückzuführen. Der Anstieg der LNA-Menge spiegelt sich im Zetapotential jedoch nicht signifikant wieder.

Die Bestimmung der Oberflächenbelegung an LNA und NLS_{Cys} wurde mittels Ultrazentrifugation bestimmt. Abbildung 44 A zeigt den Vergleich der Größenverteilung von AuNP-LNA- und AuNP-LNA-NLS_{Cys}-Konjugaten, welche mittels *analytischer Ultrazentrifugation* ermittelt wurde, vor und nach der Aufreinigung mittels Ultrazentrifugation.²⁶ Anhand der Abbildung ist zu erkennen, dass die Verteilungen beider Konjugatvarianten geringe Verteilungsbreiten von 0,22 nm bis 0,78 nm aufweisen. Die Hauptpeaks liegen bei 6,3 nm für die nicht zentrifugierten Proben und bei 5,8 nm für die zentrifugierten Proben. Nach der Aufreinigung weisen die Konjugate breitere Verteilungen (+0,3 nm) auf. Das Peakmaximum der Verteilungen ist um 0,59 nm (AuNP-LNA) und 0,65 nm (AuNP-LNA-NLS_{Cys}) zu geringeren Größen verschoben. Weiterhin ist bei den Konjugaten nach der Aufreinigung ein zweiter Peak (AuNP-LNA-NLS_{Cys}) bei 7,2 nm und ein Ausläufer (AuNP-LNA) bis 10 nm zu erkennen.

Bei der Auswertung wurden nur die Parameter für Gold verwendet, da eine Abschätzung der Ligandenhülle und der hieraus resultierenden Dichte einen zu großen Fehler nach sich ziehen würde. Die Verschiebung des Peaks kann aufgrund der Ligandenbelegung zustande kommen. Das Auftreten größerer Partikel (7,2 nm und 7-10 nm) hingegen kann auf nicht vollständig redispergierte Partikel nach der Aufreinigung hindeuten. Im Vergleich zu den Messungen mittels *Dynamischer Lichtstreuung* (Abbildung 43 A) sind insbesondere unter Verwendung des Peptids geringere Konjugat-Größen ermittelt worden. Der Grund hierfür liegt in der Messmethode. Im DLS wird die Partikelstreuung in der gesamten Probe gemessen,

²⁶ Die Größenverteilung wurde in diesem Experiment mit Hilfe der *Analytischen Ultrazentrifugation* (AUZ) gemessen und mit dem Programm *Sedfit* ausgewertet.

wobei die Anwesenheit großer Partikel und Agglomerate das Signal von kleineren Partikeln überdeckt, sodass diese im Messergebnis nicht mehr auftreten. In der AUZ hingegen sedimentieren die Partikel abhängig von ihrer Größe und ihrem Gewicht, dies ermöglicht eine differenzierte Messung der Partikelgröße. Allerdings kann hier innerhalb von einer Messung nur ein bestimmter Bereich an Partikelgrößen gemessen werden, da Partikel verschiedener Größen unterschiedlich schnell sedimentieren und dies bei zu großen Unterschieden in der Auswertung nicht mehr hinreichend aufgelöst werden kann. In diesem Fall wurde das Hauptaugenmerk auf Einzelpartikelkonjugate gelegt, da die Peptidagglomeration durch die vorherige Funktionalisierung mit der LNA die Partikel vorstabilisiert. [209]

Die Leistungsfähigkeit der AUZ bezüglich der besseren Differenzierung auftretender Moden ist auch in dem Vergleich mit der *analytischen Scheibenzentrifuge* zu erkennen. Da beide Methoden auf dem Prinzip der Sedimentation beruhen, ist auch bei dieser Methode die Analyse von zwei Größenbereichen, welche sich um den Faktor 10-20 unterscheiden, ungeeignet. Bei der Messung mittels ASZ wird im Vergleich zur AUZ lediglich eine breite Mode zwischen 5 nm und 10 nm erhalten, wohingegen durch die Messung mit der AUZ zwei getrennte Moden in dem gleichen Größenbereich erhalten werden. (Abbildung 44 B) Anhand dieser Erkenntnisse wird deutlich, dass die DLS komplementär zu Analyse mittels AUZ und ASZ einzusetzen ist.

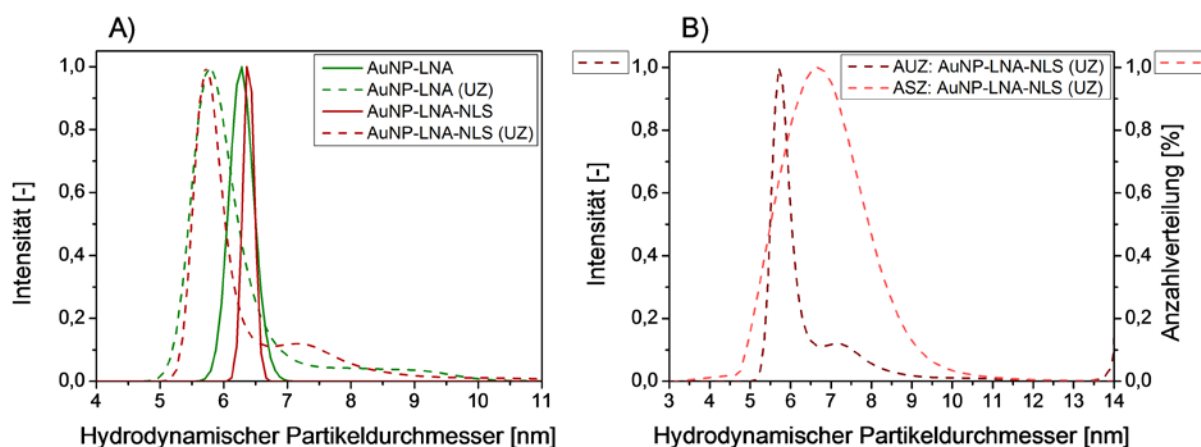


Abbildung 44: Verteilung des hydrodynamischen Partikeldurchmessers von AuNP-5'LNA_{30T10}- und AuNP-5'LNA_{30T10}-NLS_{Cys}-Konjugaten vor und nach der Aufreinigung mittels präparativer Ultrazentrifugation.²⁶ Die Initialkonzentration der Oligonukleotide beträgt 0,7 μ M und die Initialkonzentration vom NLS_{Cys}-Peptid beträgt 2 μ M.

Neben dem bisher beschriebenen NLS_{Cys}-Peptid wurde ferner die Belegung von zwei weiteren Peptiden auf 5'LNA_{36T10}-Konjugate ermittelt. Es wurden ein hydrophiles Deca-Arginin (CWR₁₀) und ein hydrophobes Peptid (CWKLPVM) ausgewählt. Das

NLS_{Cys}-Peptid besteht aus 14 Aminosäuren und ist dreifach positiv geladen, das CWR₁₀ besteht aus 12 Aminosäuren und trägt eine Nettoladung von +10. Das CWKLPVM ist nur einfach positiv geladen und besteht aus 7 Aminosäuren.

Die Oberflächenbelegung der Peptide auf AuNP-5'LNA36_{T10}-Konjugate ist in Abbildung 45 dargestellt. (Die Kalibrationen befinden sich im Anhang, Kapitel 7.8.1) Es ist ersichtlich, dass sich die Anzahl gebundener Peptid-Liganden pro Nanopartikel mit steigender Initialkonzentration des Peptids erhöht. Dies tritt für alle drei Peptide unterschiedlich stark auf. Anzumerken ist hierbei, dass die Belegung an LNA bei allen Varianten, bis auf eine Ausnahme (7,5 LNA/AuNP), bei etwa 15 Liganden pro AuNP liegt. Ausgehend von der Nettoladung der Peptide war die Erwartung, dass im gegenseitigen Vergleich CWR₁₀ eine bessere und CWKLPVM eine schlechtere Konjugation der AuNP-LNA-Konjugate erreicht. [72] Entsprechend dieser Erwartung konnte für das Peptid CWKLPVM eine um 2 (2 μ M) und 203 (10 μ M) Liganden pro AuNP geringere Belegung als für das NLS_{Cys}-Peptid gefunden werden. Das CWKLPVM besteht aus halb so vielen Aminosäuren wie das NLS_{Cys} und es besitzt eine geringere Nettoladung, wodurch eine geringere elektrostatische Anziehung zwischen den negativ geladenen LNA-Liganden der Konjugate und den Peptidliganden besteht. Des Weiteren hat dieses Peptid hydrophobe Eigenschaften, wodurch die Wechselwirkungen in wässriger Umgebung ebenfalls gehemmt sind.

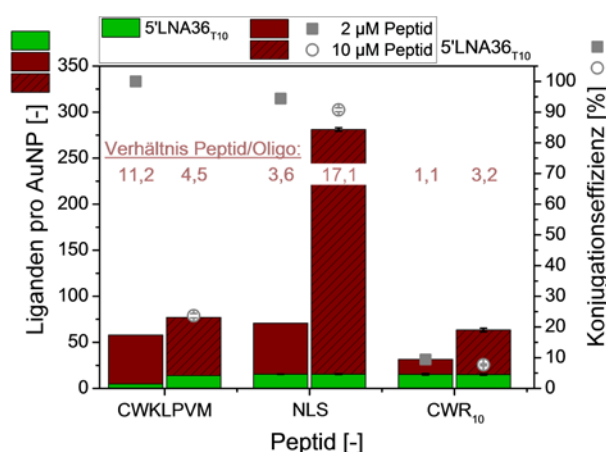


Abbildung 45: Vergleich verschiedener Peptide. Oberflächenbelegung (links) und Konjugationseffizienz (rechts) der Peptide NLS_{Cys}, CWR₁₀ und CWKLPVM bei verschiedenen Initialkonzentrationen bei der Anbindung auf AuNP-5'LNA36_{T10}-Konjugate. Die Initialkonzentration der Oligonukleotide beträgt 0,7 μ M.

Entgegen der Erwartung zeigte das Deca-Arginin die geringste Oberflächenbedeckung. Aufgrund der hohen Nettoladung von +10 und der starken negativen Ladung der AuNP-LNA-Konjugate müssten starke Anziehungskräfte zueinander bestehen. Eine mögliche Erklärung dieses Verhaltens kann in der Faltung

des Peptids liegen. Bei pH 7, bei dem die Konjugate hergestellt wurden, trägt jedes der Arginine eine positive Ladung. Dies führt dazu, dass 10 der 12 Aminosäuren in dem Deca-Arginin geladen sind. Es kann vermutet werden, dass das Peptid deshalb den energetisch bestmöglichen Zustand einnimmt, welcher die Streckung der Sequenz ist. Hierbei kann angenommen werden, dass die Liganden sich um die Partikel legen und somit die Partikeloberfläche für weitere Liganden blockieren. [17, 86]

Bei dem Vergleich der beiden unterschiedlichen Initialkonzentrationen ist bei den AuNP-5'LNA36_{T10}-CWR₁₀-Konjugaten keine fünffache Erhöhung der angebundenen Liganden zu verzeichnen, obwohl zwischen den beiden Konzentrationen ein Faktor von fünf liegt. Die Belegung steigt jedoch um fast das Dreifache an. Dieser Effekt lässt trotzdem vermuten, dass bei der Anwesenheit einer größeren Anzahl an Liganden, welche für die Konjugation zur Verfügung stehen, ein Aufrichten der Liganden wahrscheinlicher ist als dass sie sich um die Partikel legen. Dadurch wird mehr Platz auf den Nanopartikeln geschaffen und eine erhöhte Beladung erreicht. [16, 17, 86, 204]

Die hohe NLS_{Cys}-Belegung bei einer Initialkonzentration von 10 µM entspricht etwa der fünffachen Belegung von 55,2 Liganden pro Nanopartikel aus dem Experiment mit einer Initialkonzentration von 2 µM Peptid. Bei dem CWKLPVM-Peptid wird die Oberflächenbedeckung nicht durch die Erhöhung der Initialkonzentration beeinflusst. Dies kann auf ein Zusammenspiel der geringen positiven Ladung und der Hydrophobizität des Peptidliganden zurückzuführen sein. Wie bereits erwähnt, ist bei der Peptidkonjugation ein wichtiger Punkt die Stabilität, insbesondere wenn es sich um positiv geladene Sequenzen handelt. [72] Für die Interaktion eines hochgeladenen, hydrophilen Konjugats mit einem hydrophoben Liganden ist offensichtlich nur eine geringe Affinität vorhanden, sodass die Oberflächenbedeckung schon bei geringen Konzentrationen gegen eine Sättigung läuft.

Die Oberflächenbelegung an CWKLPVM war für die beiden verschiedenen Initialkonzentrationen vergleichbar, weshalb ähnliche Ergebnisse bei der Stabilität zu erwarten waren. Diese Erwartung wird durch die Ergebnisse der SPR-Verschiebung und des Zetapotentials bestätigt. (Abbildung 46 B und D) Die Verschiebung des SPR-Peaks weist einen Unterschied von lediglich 1 nm auf, dies liegt innerhalb der Fehlertoleranz. Bei dem Zetapotential ist das Konjugat mit 10 µM Initialkonzentration um 5 mV weniger negativ geladen, dies liegt jedoch innerhalb der

Standardabweichung und mit -43,4 mV noch immer in dem Bereich stabiler Kolloide. Sowohl die Werte des Primärpartikelindex als auch der hydrodynamische Durchmesser der CWKLPVM-Konjugate (Abbildung 46 A und C) weisen bezüglich der Initialkonzentration gegenläufige Ergebnisse auf.

Dementsprechend sind die Konjugate mit 10 μM des eingesetzten Peptids mit einem PPI von 7,3 weniger stabil als die mit 2 μM , welche einen PPI von 15,5 haben. In der Größe unterscheiden sich die Konjugate um ~ 24 nm, wobei die Konjugate mit 10 μM größer sind. Dies ist unerwartet, weil die Konjugate ein Peptid/LNA-Verhältnis von 4,5 aufweisen und damit weniger positive Ladungen im Überschuss vorliegen als bei den Konjugaten, welche mit 2 μM Peptid hergestellt wurden. Diese weisen ein Verhältnis von 11,2 Peptiden/LNA auf. Für eine genaue Erklärung dieser Ergebnisse sind Untersuchungen weiterer Peptidkonzentrationen notwendig.

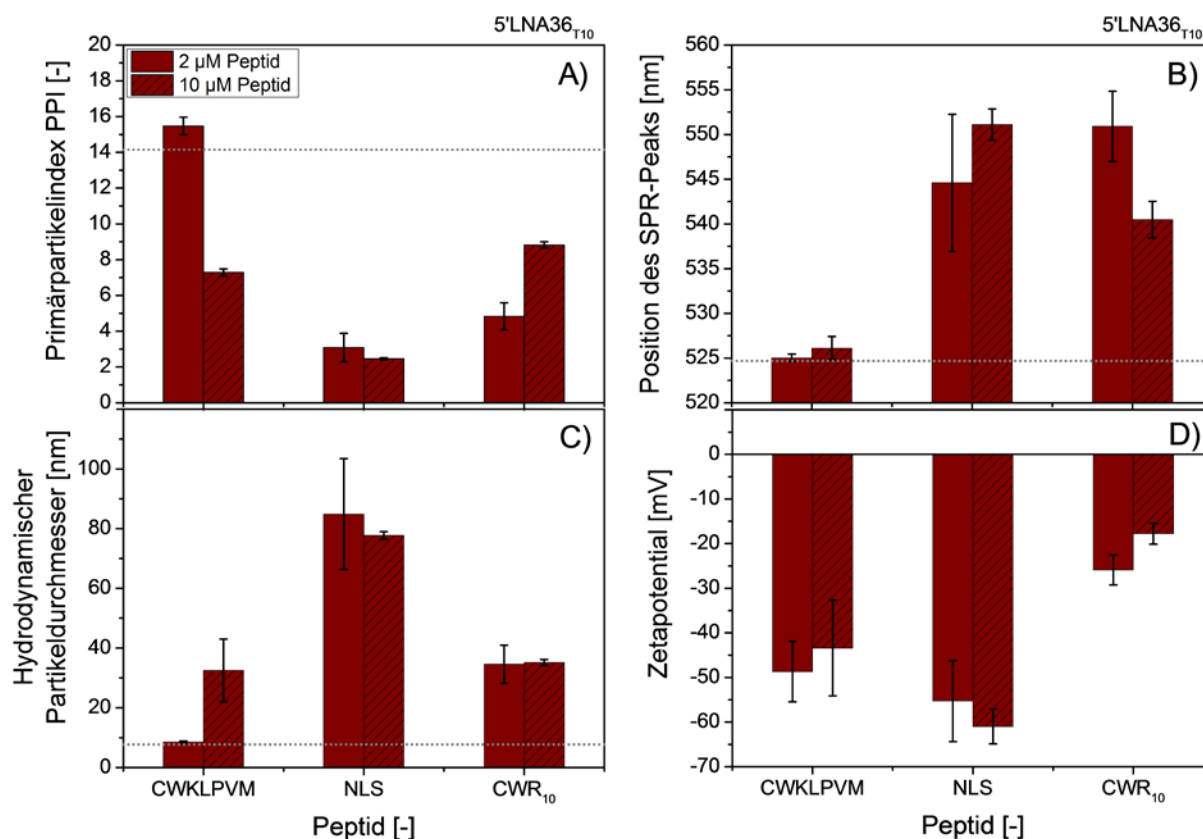


Abbildung 46: Vergleich verschiedener Peptide. Primärpartikelindex (A), Position des SPR-Peaks (B), hydrodynamischer Partikeldurchmesser (C) und Zetapotential (D) der Peptide NLS_{Cys}, CWR₁₀ und CWKLPVM bei verschiedenen Initial-Konzentrationen bei der Anbindung auf AuNP-5'LNA36T₁₀-Konjugaten. Die gestrichelten Kennlinien markieren die Werte der AuNP-LNA-Konjugate ohne Peptid. Die Initialkonzentration der Oligonukleotide beträgt 0,7 μM .

Die Ergebnisse aus der DLS und des PPI zeigen eine vermehrte Agglomeratbildung, die sich in der Verschiebung des SPR-Peaks nicht deutlich zeigt, aber durch die vermehrten hydrophoben Wechselwirkungen bei höheren Konzentrationen entstehen.

Bei dem NLS_{Cys}-Peptid treten stärkere Agglomerationseffekte auf, welche durch alle Methoden, außer durch das Zetapotential, zu erkennen sind. Im Vergleich zu den Ergebnissen des CWKLPVM (10 µM) sind die Konjugate mit NLS_{Cys} größer und weisen sowohl einen geringeren PPI als auch eine größere SPR-Verschiebung auf. Dieser stärker auftretende Effekt kann auf die höhere Nettoladung zurückgeführt werden, wodurch ein veränderter Ladungsausgleich auftritt. [72] Je stärker die positive Ladung ist, desto leichter werden die Partikel bei gleicher Konzentration destabilisiert. Es ist jedoch zu erkennen, dass trotz fünffacher Beladung an NLS_{Cys} die Unterschiede gering ausfallen. Hierbei kann ein nichtlinearer Effekt angenommen werden, bei dem die elektrostatischen Effekte möglicherweise durch die sterischen Effekte bei höheren Oberflächenbeladungen überlagert werden. Weiterhin ist die Standardabweichung für die Proben, welche mit 2 µM NLS_{Cys} hergestellt wurden, im Vergleich zu den Mittelwerten groß. Dies deutet auf eine schlechtere Reproduzierbarkeit der Agglomeratbildung für kleine Konzentrationen weit unterhalb der Sättigungskonzentration (~10% von 393 Liganden/AuNP) hin. Möglicherweise sind die Peptidliganden unregelmäßig auf den Partikeln verteilt, was zu unterschiedlich starken Agglomerationstendenzen führt.

Im Fall des CWR₁₀ ist die Destabilisierung bei der Probe aus 10 µM Peptid geringer, dies ist auf die höhere Beladung und hierdurch eine zusätzliche sterische Stabilisierung zurück zu führen. Dieses Verhalten wurde bereits bei ligandenfreien Nanopartikeln entdeckt, bei denen der Ladungsausgleich durch die Konjugation zur Destabilisierung führte. [72] Hierbei sind die Partikel durch die LNA elektrosterisch vorstabilisiert, weshalb die Partikel trotz betragsmäßig geringem Zetapotential von -26 mV und -18 mV nicht ausfallen. [209] Es treten ebenfalls Konzentrationseffekte auf, welche zu unterschiedlich gut stabilisierten Konjugaten führen. [72]

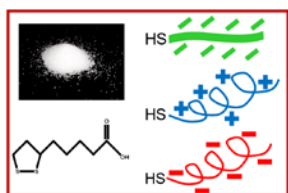
Ein weiterer Grund für die unterschiedliche Stabilität zwischen CWR₁₀ und NLS_{Cys} ist auf die Nettoladung zurückzuführen. Bei dem CWR₁₀ ist es einfacher eine auftretende Agglomeration zu hemmen, weil bei Erhöhung der Oberflächenbelegung mehr als das Dreifache der positiven Ladungen pro Ligand ins System gebracht wird. Dies überwindet den Ladungsausgleich effektiver und somit resultieren stabilere Konjugate. Bei dem NLS_{Cys} müssten mehr Liganden eingesetzt werden, um einerseits den Ladungsausgleich zu überwinden und andererseits oberhalb des isoelektrischen Punktes der Konjugate eine zusätzlich sterische Stabilisierung zu erreichen. [72]

Zusammenfassend besteht bei dem Einfluss von Peptiden auf AuNP-LNA-Konjugaten die Möglichkeit, neben dem Oligonukleotid mindestens einen weiteren Liganden auf der Oberfläche von 5 nm Goldnanopartikeln zu binden. Ausgehend von den Ergebnissen der Oberflächenbedeckung ist außerdem noch genügend Platz auf den Nanopartikeln für weitere funktionelle Liganden. Es wurden drei verschiedene Peptidsequenzen untersucht, welche in ihrer Oberflächenbedeckung zu einer vielfachen Anzahl an Liganden, gegenüber der LNA, führen. Somit resultieren Konjugate mit einer zur funktionellen Anwendung realistischen Menge an Liganden. Bezogen auf die verschiedenen Liganden ist es schwierig eine einheitliche Aussage über den Einsatz von Peptiden zu machen. Für eine Vorhersage der Oberflächenbedeckung und der Konjugatstabilität müssen alle Eigenschaften (Nettoladung, Länge und Hydrophobizität) der Peptide in Betracht gezogen werden.²⁷

²⁷ Weitere Ergebnisse sind ergänzend in Kapitel 7.8.7. im Anhang zu finden.

4.2.6. Einfluss von Biomolekülen auf mit Salz behandelte

Goldnanopartikel-Konjugate



In dem vorhergehenden Kapitel wurden bifunktionale Konjugate bestehend aus zwei funktionellen Liganden beschrieben, Oligonukleotiden und Peptiden. Es soll im Folgenden der Einfluss verschiedener Liganden wie Liponsäure, 5'LNA36_{T10}, SAP und CWR₁₀ auf Goldnanopartikel, welche zuvor *ex situ* mit Salz behandelt wurden, untersucht werden. Die hierbei verwendeten Salze sind Trinatriumcitrat, Natriumchlorid und Natriumphosphatpuffer, deren Einfluss auf die Partikelstabilität bereits in Kapitel 4.2.1 beschrieben wurde.

Ausgehend von den bisher beschriebenen Effekten der hierfür verwendeten Liganden, kann erwartet werden, dass die Stabilität und damit der Primärpartikelindex der Partikel in Anwesenheit von Liponsäure und CWR₁₀ bezogen auf die mit Salz behandelten Partikel sinkt. Für SAP kann eine geringe Reduktion des PPI und für LNA eine erhöhte Stabilität erwartet werden. Diese Erwartungen werden zum Teil bei der Konjugation auf mit Salz behandelten Goldnanopartikeln bestätigt. Alle PPI-Werte der Konjugate liegen unterhalb von den Ergebnissen, die von den nur mit Salz behandelten Nanopartikeln stammen und in Abbildung 47 als schwarze Sterne dargestellt sind.

Bei der Konjugation mit 22 μM SAP (330 Liganden/AuNP), 2 μM 5'LNA36_{T10} (33 Liganden/AuNP) und 69 μM Liponsäure (1053 Liganden/AuNP) auf AuNP-Citrat³⁻ sind geringe Änderungen des Primärpartikelindex in Abhängigkeit des pH-Wertes und der Ladungsmenge zu verzeichnen.²⁸ (Abbildung 47 A und B oben)

Die geringste Änderung ist bei der Verwendung von LNA zu finden, bei der eine Erhöhung des PPI von 20,7 auf 22,3 erfolgt. Bei dieser Datenreihe wurde jedoch nur eine geringe Anzahl an Proben untersucht, was eine unzweifelhafte Schlussfolgerung erschwert. Bezogen auf die AuNP-Citrat³⁻-Konjugate ist ein Verlust von 16,7 PPI-Punkten zu verzeichnen.

²⁸ Die unterschiedlichen Konzentrationen der Liganden sind aus den vorhergehenden Untersuchung zu monofunktionalen Konjugaten bestimmt worden und stellen für Goldnanopartikel ohne *Ex-situ*-Salzbehandlung optimale Initialkonzentrationen dar.

Einen ebenfalls schwachen Effekt zeigt die Konjugation mit Liponsäure. Hierbei steigt der PPI zunächst von 18,0 auf 18,7 bei 3.330 Ladungen/AuNP an und sinkt auf 16,5 (133.200 Ladungen/AuNP) ab, bevor dieser bei 266.400 Ladungen/AuNP auf 20,2 ansteigt und konstant bleibt. Der maximale Verlust der Stabilität im Vergleich zu den Ausgangspartikeln beträgt bei diesem System -19,4 und liegt bei 6.700 Ladungen/AuNP. Unter Verwendung von SAP steigt der PPI von 20,1 bei 1 Ladung pro AuNP auf 25,2 bei 33.300 Ladungen/AuNP und bleibt konstant. Die Reduktion des PPI ist hier ebenfalls bei 6.700 Ladungen/AuNP mit einem Wert von 14,3 am geringsten.

Die Konjugation der AuNP-Citrat³⁻-Partikel mit Deca-Arginin (10 µM, 152 Liganden/AuNP) weist einen gegensätzlichen Effekt auf. Die Reduktion beträgt 34,5 PPI-Punkte (6.700 Ladungen/AuNP). Die Destabilisierung durch die Konjugation mit CWR₁₀ wird mit steigender Anzahl an Oberflächenladung, welche durch die Citrat-Liganden hervorgerufen wird, verstärkt. Der PPI sinkt von 10,7 bei 1 Ladung/AuNP auf 3,1 bei 3.330 Ladungen/AuNP und bleibt konstant. An diesem Punkt liegt ein pH-Wert $\geq 6,47$ vor.

Dies entspricht nicht der Erwartung, da mit steigender negativer Oberflächenladung die Partikel gegen die Agglomeration stabilisiert werden müssten. Das Zetapotential der reinen AuNP-Citrat³⁻-Konjugate (Kapitel 4.2.1, Abbildung 18 A) weist jedoch keinen stetig sinkenden Wert auf, sondern bleibt ab 1.300 Ladungen/AuNP konstant. Dieser Punkt liegt knapp unter dem Wert, an dem die Destabilisierung durch das CWR₁₀-Peptid konstant wird. Eine mögliche Erklärung ist, dass die Peptid-Liganden zunächst verstärkt von der negativeren AuNP-Oberfläche angezogen werden und anschließend ein Ligandenaustausch erfolgt. Der konstante Bereich lässt auf ein Sättigungsverhalten der Konjugation schließen. Das stetig absinkende Zetapotential der AuNP-Citrat³⁻-CWR₁₀-Konjugate (Abbildung 48 A oben) mit steigender Anzahl an Ladungen weist darauf hin, dass der Ladungsaustausch insbesondere bei hohen Citrat³⁻-Konzentration nicht vollständig abläuft. [15, 213]

Die Existenz von Citrat³⁻-Anionen führt bei der monofunktionalen Konjugation (Kapitel 4.2.1, Abbildung 17 A und C) zu einer in Abhängigkeit der Ladungszahl auftretenden Stabilisierung, welche bei der bifunktionalen Konjugation mit einem zweiten, thiolisierten Liganden keinen Einfluss auf die Konjugateigenschaften zu haben scheint. Bei CWR₁₀ tritt der bereits beschriebene Ladungsausgleich auf. Bei

Liponsäure, SAP und 5'LNA36_{T10} hingegen spiegelt sich dies in dem nahezu unveränderten Stabilitätsverhalten der Konjugate wieder. Demnach ist auch für die negativ geladenen Liganden eine mögliche Erklärung das Auftreten eines Ligandenaustausches. [213, 214] Die Biomoleküle haben einen unterschiedlichen Platzbedarf auf den Partikeln. Aufgrund der Tatsache, dass jedoch innerhalb einer Probenreihe jeweils die gleiche Menge der Biomoleküle eingesetzt wurde, ändert sich der Platzbedarf nicht in Abhängigkeit der Ladungsmenge an Citrat³⁻. Demnach ist anzunehmen, dass bei erhöhtem Einsatz an Trinatriumcitrat auch mehr Citrat³⁻-Anionen von der Oberfläche oder aus den zuvor gebildeten Citrat³⁻-Multilagern [213] verdrängt werden.

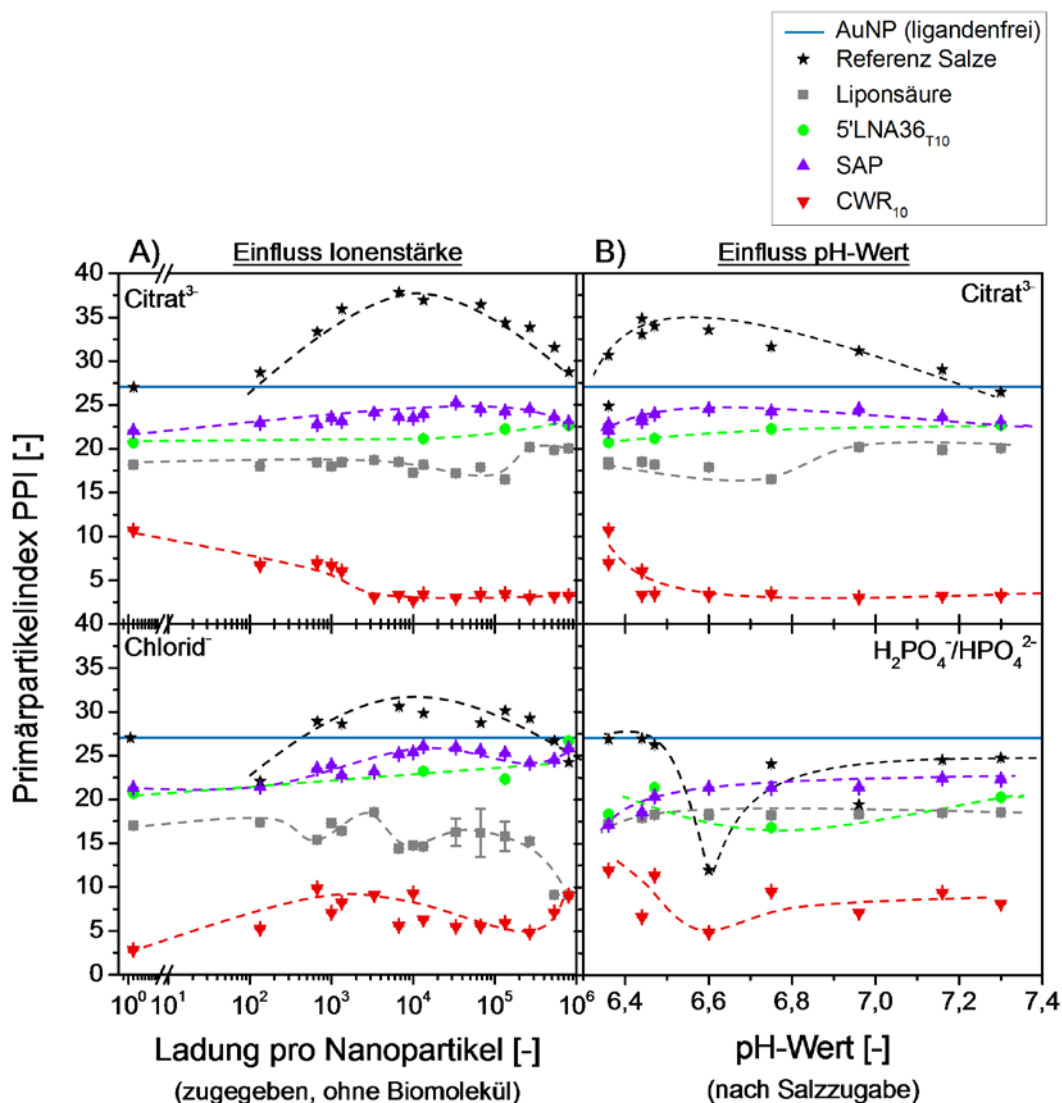


Abbildung 47: Stabilität von bifunktionalen Konjugaten. Darstellung des Primärpartikelindex von bifunktionalen Konjugaten für die Biomoleküle Liponsäure, 5'LNA36_{T10}, SAP und CWR₁₀ auf der Basis von Citrat-, Chlorid- und Phosphat-konjugierten Goldnanopartikeln in Abhängigkeit der Ladung pro Nanopartikel (A) und des pH-Wertes. (B) Die blauen Kennlinien stellen die Werte der ligandenfreien Nanopartikel (ohne Ex-situ-Zugabe von Salz und Liganden) dar. Die Ionenstärken der Salze betragen 0 – 54 mM NaCl, 0 – 108 mM Trinatriumcitrat und 8,6 - 17,2 mM NaPP. Die eingesetzten Ligandenkonzentrationen betragen 69 µM Liponsäure, 2 µM 5'LNA36_{T10}, 22 µM SAP und 10 µM CWR₁₀.

Bei den AuNP-Chlorid-Konjugaten (Abbildung 47 A unten) tritt bei der Reduktion des PPI bezogen auf die monofunktionalen Partikel (Kapitel 4.2.1, Abbildung 17 A) die gleiche Reihenfolge der Liganden auf wie bei der Anwendung auf Citrat³⁻-funktionalisierte Nanopartikel. Die AuNP-Chlorid-LNA-Konjugate weisen die gleichen PPI-Werte auf wie bei dem Einsatz von Trinatriumcitrat. Bei der Verwendung von Liponsäure ist in Gegenwart von Cl⁻ ein erster Anstieg des PPI (+1,6) nach Hinzugabe von 3.330 Ladungen zu verzeichnen. Bei höheren Ladungen erfolgt eine Reduktion des PPI bis zu einem Wert von 9 (800.000 Ladungen/AuNP).

Bei dem Einsatz von SAP auf AuNP-Cl⁻ ist in Abhängigkeit der Ladungsmenge der gleiche Verlauf, jedoch weniger ausgeprägt, wie bei Trinatriumcitrat zu erkennen. Der maximale PPI liegt bei 26,1 (13.320 Ladungen/AuNP) und der Unterschied zu den Ausgangspartikeln liegt bei -5,4. Bei höheren Ladungen unter Verwendung von Na₃Citrat sinkt der PPI weiter, bei Chlorid hingegen ist ab 266.400 Ladungen pro Nanopartikel ein erneuter Anstieg zu verzeichnen bis der maximale PPI bei 800.000 Ladungen/AuNP wieder erreicht wird.

Bei der Konjugation mit CWR₁₀ ist bei den AuNP-Cl⁻-Partikeln ein Anstieg des PPI nach Zugabe von 670 Ladungen der Chlorid-Ionen um +7,1 auf einen PPI von 9,9 zu verzeichnen. Erst bei höheren Ladungen tritt erneut eine Reduktion des PPI auf, welche jedoch bei 266.400 Ladungen pro Nanopartikel ansteigt, wie bei SAP.

Bei mit Phosphat-Anionen vorbehandelten Partikeln (Abbildung 47 B unten) ist für SAP der gleiche Verlauf wie bei der Konjugation auf Citrat-stabilisierte Nanopartikel zu erkennen. Während im letzteren Fall eine Stabilisierung bei pH 6,4 - 6,6 um +2,4 PPI-Punkte auftritt, sind generell im ersten Fall kleinere PPI-Werte von maximal 22,4 ersichtlich und der Anstieg in dem genannten pH-Bereich beträgt +4,3 bei einem PPI von 17,1 bis 21,4. Die PPI-Werte von AuNP-H₂PO₄⁻/HPO₄²⁻-LS- und AuNP-H₂PO₄⁻/HPO₄²⁻-LNA-Konjugaten in Abhängigkeit des pH-Wertes zeigen einen ähnlichen Verlauf wie die Werte von den Citrat³⁻-Konjugaten. Die LNA-Konjugate auf Basis von Phosphat-stabilisierten Partikeln liegen hierbei mit den PPI-Werten von etwa 19 unterhalb von denen, welche mit Na₃Citrat stabilisiert worden sind. Die LS-Konjugate hingegen steigen zunächst bis pH 6,5 an und bleiben bei einem PPI von 18,3 konstant bis pH 7,3.

Nach der Konjugation mit CWR₁₀ tritt eine Reduktion des PPI unter Verwendung von Phosphatpuffer bei pH 6,4 - 6,8 auf und liegt bei -2,4 PPI-Werten. Für höhere pH-Werte liegt der PPI konstant bei etwa 8.

Die Betrachtung des Zetapotentials (Abbildung 48) zeigt, dass im Allgemeinen die Erwartungen erfüllt werden. Die Konjugate mit 5'LNA36_{T10}, SAP und Liponsäure liefern negative Werte des Zetapotentials und mit CWR₁₀ werden positiv geladene Konjugate erhalten. Letzteres gilt nur für Nanopartikel mit Natriumchlorid und Natriumphosphatpuffer. In Anwesenheit von Trinatriumcitrat ist das Zetapotential abhängig von der eingesetzten Menge der Salz-Anionen.

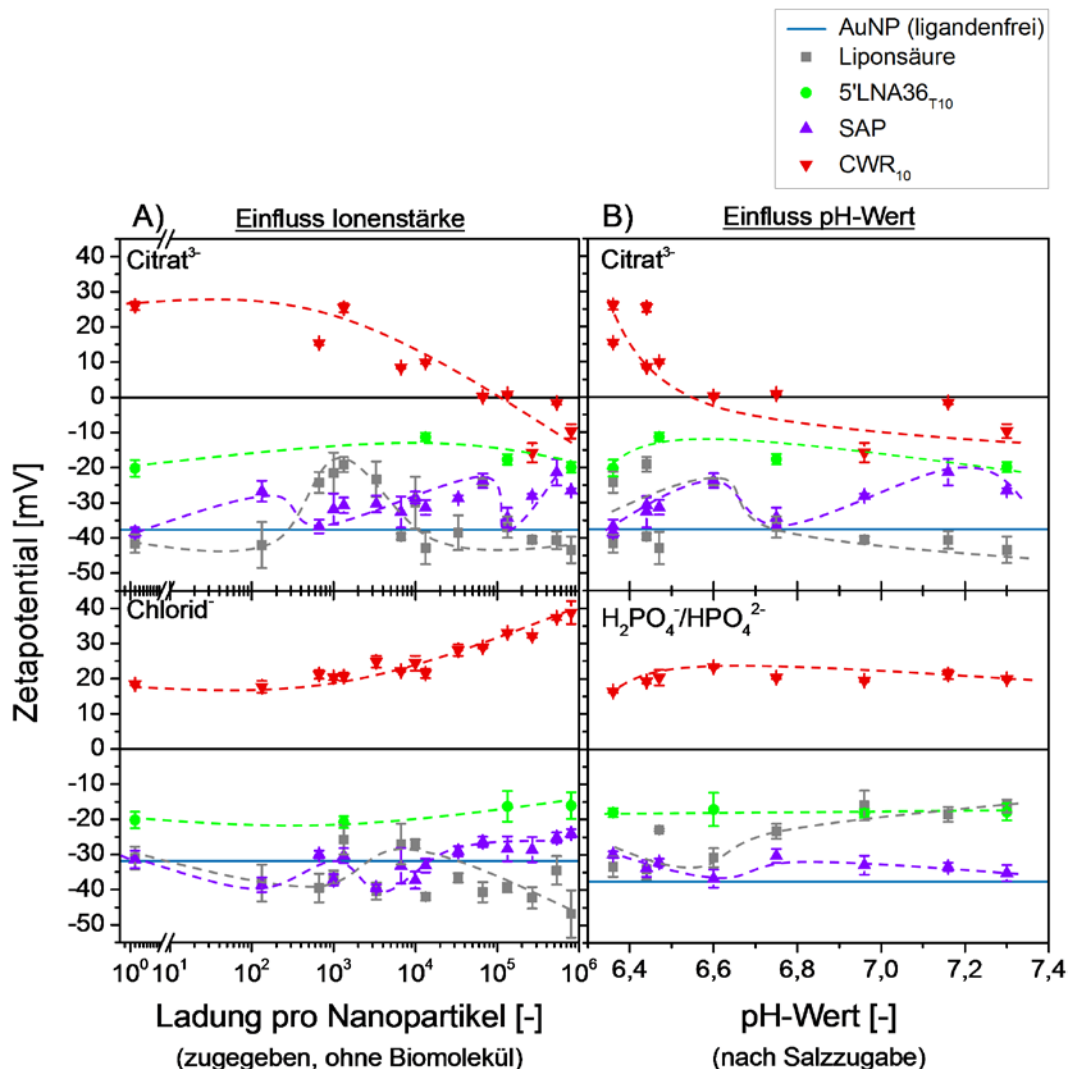


Abbildung 48: Stabilität von bifunktionalen Konjugaten. Darstellung des Zetapotentials von bifunktionalen Konjugaten für die Biomoleküle Liponsäure, 5'LNA36_{T10}, SAP und CWR₁₀ auf der Basis von Citrat-, Chlorid- und Phosphat-konjugierter Goldnanopartikel in Abhängigkeit der Ladung pro Nanopartikel (A) und des pH-Wertes. (B) Die blauen Kennlinien stellen die Werte der ligandenfreien Nanopartikel (ohne Ex-situ-Zugabe von Salz und Liganden) dar. Die Ionenstärken der Salze betragen 0 – 54 mM NaCl, 0 – 108 mM Trinatriumcitrat und 8,6 – 17,2 mM NaPP. Die eingesetzten Ligandenkonzentrationen betragen 69 µM Liponsäure, 2 µM 5'LNA36_{T10}, 22 µM SAP und 10 µM CWR₁₀.

Nach der Konjugation der verschiedenen Biomoleküle auf mit Natriumphosphatpuffer behandelte Goldnanopartikel weist das Zetapotential in Abhängigkeit des pH-Wertes für CWR₁₀, 5'LNA36_{T10} und SAP keinerlei Tendenzen auf. (Abbildung 48 B unten) Die Werte liegen bei +20 mV für die Konjugation mit CWR₁₀, bei -18 mV für 5'LNA36_{T10} und bei -33 mV für SAP. Für die Konjugate mit Liponsäure ist eine Erhöhung des Zetapotentials von $-33,4 \pm 2,8$ mV bei pH 6,4 auf $-16,1 \pm 1,8$ mV bei pH 7,3 zu erkennen. Dieser Anstieg weist auf eine Veränderung der Oberflächenladung der Nanopartikel hin, was durch die Anbindung der Liponsäure an den Nanopartikeln hervorgerufen wird und vermutlich durch einen Ligandenaustausch mit den Phosphat-Anionen erfolgt.

Für eine mögliche Erklärung muss zunächst der Grad der Deprotonierung der Phosphat-Anionen und der Liponsäure betrachtet werden. Die pKs-Werte liegen für Liponsäure bei pH 4,7 [198] und für Natriumphosphat bei pH 7,2 [188].

In dem betrachteten Bereich von pH 6,4 bis pH 7,3 liegt die Liponsäure der Theorie nach deprotoniert vor. Es kann davon ausgegangen werden, dass bei einem höheren pH-Wert die Deprotonierung stärker vorliegt. Im Fall des Natriumphosphatpuffers liegen unterhalb von einem pH-Wert von 7,2 die Phosphat-Anionen hauptsächlich als H₂PO₄⁻ vor. Bei pH 7,2 liegen gleich viele H₂PO₄⁻-Ionen wie HPO₄²⁻-Ionen vor.

Bei der Anbindung der Liponsäure an die Goldnanopartikel verdrängen die Liponsäure-Liganden bei pH 6,4 die einwertigen Phosphat-Anionen von der Partikeloberfläche, dies führt durch den Austausch von mehr als einem H₂PO₄⁻-Ion durch einen LS-Liganden zu weniger negativen Ladungen auf der Partikeloberfläche. Hierdurch ergibt sich ein geringfügig höheres Zetapotential. (Anhang: Tabelle 26) Bei einem größeren pH-Wert werden die Phosphat-Anionen ebenfalls von der AuNP-Oberfläche verdrängt. Allerdings ist hierbei zu berücksichtigen, dass neben den einwertigen Phosphat-Anionen ebenfalls zweiwertige Anionen vorliegen. Die HPO₄²⁻-Ionen sind stärker hydratisiert [194] und sind demnach schwächer an der Oberfläche der Nanopartikel gebunden. [85] Demzufolge kann angenommen werden, dass diese Spezies bei der Konjugation mit Liponsäure, welche kovalent an die Goldoberfläche bindet, bevorzugt von der Partikeloberfläche verdrängt wird. Dadurch wird die Oberflächenladung reduziert.

Der beschriebene Ligandenaustausch findet vermutlich auch bei der Konjugation mit 5'LNA36_{T10}, SAP und CWR₁₀ auf AuNP-H₂PO₄⁻/HPO₄²⁻-Konjugaten statt. Jedoch ist zu vermuten, dass die Verdrängung der zweiwertigen Phosphat-Anionen von der

Oberfläche im Fall der Liponsäure stärker erfolgt. Dies liegt an der thiolisierten Endgruppe. Liponsäure besitzt im Gegensatz zu den anderen Liganden eine Disulfid-Gruppe, welche sich an der Partikeloberfläche befindet und dadurch einen wesentlich größeren Platzbedarf hat als Thiol-Gruppen. [196]

Die Konjugate der mit Trinatriumcitrat behandelten Goldnanopartikel weisen weitere Effekte auf. (Abbildung 48 A oben) Bei AuNP-Citrat³⁻-LS werden geringe Unterschiede der Deprotonierung der Liponsäure bestätigt. Bei niedrigen pH-Werten (pH 6,4) treten Schwankungen des Zetapotentials von $-19,1 \pm 2,1$ mV bis $-41,6 \pm 2,6$ mV auf. Bei den monofunktionalen Partikeln (Kapitel 4.2.1) liegt das Zetapotential bei -28,4 mV und -29,6 mV. Aus den vorliegenden Werten kann angenommen werden, dass es sich bei dem Ligandenaustausch mit Citrat³⁻-Anionen nicht um ein 1:1-Verhältnis [213] handelt, sondern um einen Überschuss der Anionen. Dies entspricht der Erkenntnis, dass die Anbindung von Liganden auf Citrat-stabilisierte Goldnanopartikel wesentlich weniger als einer Monolage entspricht, selbst bei Einsatz einer Überschussskonzentration der Liganden. [213]

Die LNA-Konjugation zeigt keine Tendenz des Zetapotentials in Abhängigkeit des pH-Wertes. Das Zetapotential ist höher als bei den Ausgangspartikeln. In diesem Fall ist es möglich, dass das bei der Konjugation verwendete NaCl zur Abschirmung der Ladungen (siehe Konjugationsprotokoll Kapitel 7.2.2.1) zu einem messbar höherem Zetapotential führt.

Wie bereits bei der monofunktionalen Konjugation mit SAP (Kapitel 4.2.1, Abbildung 25 B) ist hierbei im Allgemeinen kein Anstieg des Zetapotentials zu erwarten, weil es sich um ein negativ geladenes Peptid handelt. In dem vorliegenden Datensatz (Abbildung 48 B oben) ist ein unregelmäßiger Verlauf der Zetapotential-Werte zu finden, welcher in Abhängigkeit des pH-Wertes und der Ladung/AuNP ansteigt. Dies erfolgt von -36,7 mV bei pH 6,4 (130 Ladungen/AuNP) auf -26,5 mV bei pH 7,3 (800.000 Ladungen/AuNP). Aufgrund der Tatsache, dass bei jeder Probe die gleiche Menge an SAP-Liganden zugegeben wurde, der Platzbedarf des Biomoleküls gleichbleibt und die Menge an Citrat³⁻-Anionen mit steigendem pH-Wert zunimmt, müsste das Zetapotential entweder konstant bleiben oder sinken. Der Anstieg des Zetapotentials wird demzufolge durch eine Reduktion der Oberflächenladung verursacht. Dies kann durch einen Ligandenaustausch erfolgen, bei dem mehr Citrat-

Liganden von der Partikeloberfläche entfernt werden als SAP-Moleküle, welche eine Nettoladung von -3 besitzen, an die Oberfläche gebunden werden.

Das Auftreten eines Ligandenaustausches wird durch die Konjugate mit positiv geladenem CWR₁₀ bestätigt. Das Zetapotential sinkt von +26,0 mV (pH 6,4, 0 Ladungen/AuNP) auf -9,7 mV (pH 7,3, 800.000 Ladungen/AuNP). Der steigende pH-Wert entsteht aufgrund der höheren Menge an Trinatriumcitrat, dies führt zu einer größeren Menge an negativen Ladungen und somit zu einem Ausgleich der positiven Ladungen des Deca-Arginins. Das Trinatriumcitrat kann nicht vollständig von der Partikeloberfläche substituiert werden und bestimmt demnach die Oberflächenladung mit. Der isoelektrische Punkt dieses Systems liegt bei pH 6,6 - 6,8 und entspricht einer Ladungsmenge von 66.600-133.200 Ladungen pro Nanopartikel.

Die destabilisierende Wirkung des CWR₁₀ liegt in Gegenwart von Natriumchlorid gegenläufig vor. (Abbildung 48 A unten) Hierbei steigt das Zetapotential mit steigender Anzahl an Ladungen von +17,7 mV (133,2 Ladungen/AuNP) auf 33,0 mV (133.200 Ladungen/AuNP) an und bleibt konstant. In diesem Fall liegen pro Deca-Arginin-Molekül das Zehnfache an positiven Ladungen vor als die Chlorid-Ionen haben. Des Weiteren gehört das Chlorid-Anion zu den chaotropen Anionen, welche die Reduktion von hydrophoben Wechselwirkungen bewirken können. Dadurch können Wasserstoffbrückenbindungen gestört [193] und beispielsweise Peptide ausgefällt werden. In diesem Fall ist eine Wechselwirkung und Destabilisierung des CWR₁₀ mit den Goldnanopartikeln reduziert. Eine dritte Möglichkeit ist die Abschirmung der positiven Ladungen des Peptids durch die Chlorid-Anionen, wodurch eine höhere Oberflächenbeladung entstehen kann.

Die SAP-Konjugate, LNA-Konjugate und Liponsäure-Konjugate weisen mit Chlorid-behandelten Partikeln vergleichbare Zetapotential-Werte auf wie bei der Konjugation mit Citrat-behandelten Partikeln. Die Tendenzen sind bei beiden Ausgangsmaterialien gleich. Der Grund hierbei kann in der Ladung der Liganden und damit vergleichbarem Verhalten liegen.

Im weiteren Verlauf soll die Oberflächenbelegung der Biomoleküle auf die mit Salz behandelten Goldnanopartikel bewertet werden. (Abbildung 49) (Die Kalibrationen befinden sich im Anhang, Kapitel 7.8.1) Die Bestimmung der Beladung an Deca-

Arginin konnte nicht durchgeführt werden, weil hierbei die Partikel ausgefallen sind. Hierdurch konnte nicht sichergestellt werden, dass die Liganden an der Partikeloberfläche blieben und somit würde das Ergebnis verfälscht.

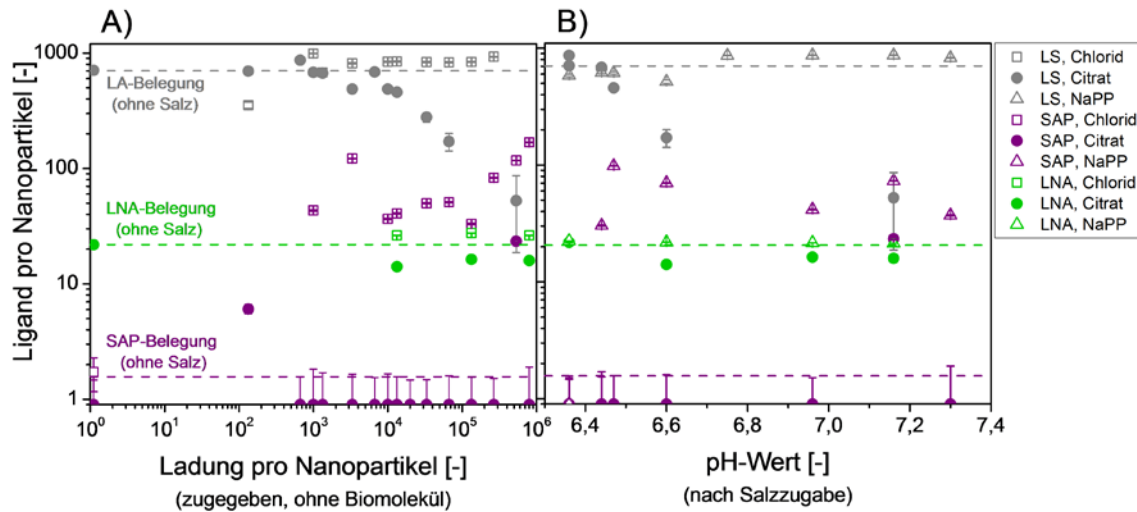


Abbildung 49: Darstellung der Oberflächenbeladung an Liponsäure, SAP und 5'LNA36T₁₀ auf Citrat- und Phosphat-konjugierten Goldnanopartikeln in Abhängigkeit der Ladung pro Nanopartikel (A) und des pH-Wertes. (B) Die Ionenstärken der Salze betragen 0 – 54 mM NaCl, 0 – 108 mM Trinatriumcitrat und 8,6 – 17,2 mM NaPP. Die eingesetzten Ligandenkonzentrationen betragen 69 μ M Liponsäure, 2 μ M 5'LNA36T₁₀, 22 μ M SAP und 10 μ M CWR₁₀.

Die ermittelte Ligandenbelegung an Liponsäure auf ligandenfreie Goldnanopartikel beträgt $707,9 \pm 11,0$ Liganden pro Nanopartikel. Diese Belegung bleibt bei der Konjugation auf mit Citrat³⁻ behandelte Nanopartikel erhalten bis zu einer Ladungsmenge pro Partikel von 6.660 Ladungen. Bei einer größeren Menge an Ladungen nimmt die Belegung ab und sinkt bis auf $52,5 \pm 33,8$ Liganden pro Nanopartikel. Die Abnahme der Oberflächenbeladung kann auf die hohe Menge an Citrat³⁻-Anionen auf der Partikeloberfläche zurückgeführt werden, wodurch ein vermehrter Ligandenaustausch notwendig ist. Dies setzt die Reaktionsgeschwindigkeit herab und senkt die Konjugationseffizienz. Zudem ist zu beachten, dass kein vollständiger Ligandenaustausch mit Citrat³⁻-Anionen erfolgt und nur weniger als eine Monolage erreicht werden kann. [213]

Aufgrund der Tatsache, dass das Zetapotential der Kolloide vor und nach der Konjugation gleich ist, kann angenommen werden, dass pro Liponsäure-Ligand drei Citrat³⁻-Anionen die Partikeloberfläche verlassen. Dies hängt auch mit dem größeren Footprint der Liponsäure aufgrund der Disulfid-Gruppe zusammen.

Bei der Konjugation von mit Natriumchlorid behandelten Partikeln ist keine Änderung der Oberflächenbelegung in Abhängigkeit der Ladungsmenge erkennbar, die Werte liegen bei etwa 800 Liganden pro Partikel. (Abbildung 49 A)

Unter Verwendung von Natriumphosphatpuffer ist eine entsprechend dem Zetapotential verlaufende Belegung zu finden. (Abbildung 49 B) Bis zu einem pH-Wert von 6,7 liegen die Werte bei 600 Liganden pro Nanopartikel, wohingegen die Belegung oberhalb von pH 6,7 bei etwa 800 Liganden pro Nanopartikel liegt. Hierbei ist anzumerken, dass die hohen Beladungen fehlerbehaftet sein können, weil Salze wie Natriumchlorid im UV-Bereich, in dem die Quantifizierung der Liganden erfolgt, absorbieren. [215]

Die Bestimmung der Belegung von SAP auf AuNP-Citrat³⁻ ergab bei den meisten Proben Werte von 0. Dies ist unerwartet, da sowohl bei den PPI-Daten zu der Stabilität und den Ergebnissen der Zetapotential-Messungen Wechselwirkungen des Liganden mit den Goldnanopartikeln ermittelt wurden. Es ist denkbar, dass SAP nicht reaktiv genug ist, um die Citrat³⁻-Ionen zu verdrängen, da es sich hierbei um ein negativ geladenes Peptid handelt. Hierbei besteht eine höhere Abstoßung der Partikel zu den SAP-Liganden, insbesondere bei der Anwesenheit von Citrat³⁻-Ionen auf der Partikeloberfläche. Dies kann möglicherweise reduziert werden, indem der Salzalterungsprozess, welcher für die Oligonukleotid-Konjugation bekannt ist, eingesetzt wird. Weiterhin kann angenommen werden, dass nur eine geringe Menge an den Partikeln gebunden hat, welche nur schwer nachgewiesen werden kann. Die Nachweisgrenze der UV-Vis-Spektrometrie liegt für dieses Peptid bei $0,05 \pm 1,2 \mu\text{M}$ was etwa $0,7 \pm 18,8$ Liganden/AuNP entspricht. Demnach ist eine Beladung in einem so geringen Konzentrationsbereich schwierig zu bestimmen. Eine bessere Bestimmung kann durch die Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen erfolgen.

Auf AuNP-Cl⁻ und AuNP-NaPP wurden hingegen höhere Belegungen an SAP von über 100 Liganden/AuNP gefunden. Im ersten Fall steigt die Belegung in Abhängigkeit der eingesetzten Ladungsmenge an Chlorid-Ionen von $43,3 \pm 0,5$ (1.000 Ladungen/AuNP) auf $168,4 \pm 0,3$ (8.000.000 Ladungen/AuNP) an. Bei NaPP hingegen bleibt die Belegung unabhängig vom pH-Wert bei etwa 40-70 Liganden/AuNP. Dieser Verlauf kann durch das Zetapotential bestätigt werden.

Die Oberflächenbelegung der LNA ist bei allen drei Varianten konstant. Die Abweichung der Belegung beträgt maximal 4,5% (NaPP), 26% (Chlorid) und 36% (Citrat). Die großen Werte in den Abweichungen kommen aufgrund der Tatsache

zustanden, dass die Referenzprobe eine Belegung von nur 21,9 Liganden pro Nanopartikel hat.

Bei der Herstellung von ligandenfreien Goldnanopartikeln mittels Laserablation in Flüssigkeiten werden häufig Salze eingesetzt, um die Partikelgröße einzustellen oder die Partikel zu stabilisieren. Diese Partikel werden unter anderem zur Biofunktionalisierung eingesetzt. Aus diesem Grund ist es bedeutend, zu wissen, welche Effekte die zugefügten Salze auf die Partikel und die Konjugate haben.

In den vorliegenden Experimenten wurden Konzentrationen bis zu 18 mM und 54 mM der Salze eingesetzt. Es treten in den kleineren, mikromolaren Bereichen häufig Stabilisierungseffekte auf, welche bei höheren Konzentrationen aufgrund der Ladungsabschirmung der Partikel abgeschwächt werden. Es ist wichtig, sämtliche Eigenschaften der Salze wie pH-Abhängigkeit, Polarisierbarkeit oder Größe zu berücksichtigen, um eine Vorhersage der auftretenden Effekte tätigen zu können.

Im Allgemeinen kann aus diesem Kapitel geschlussfolgert werden, dass für positiv geladene Biomoleküle die Chlorid-Anionen den besten Stabilisierungseffekt zeigen, gefolgt von Natriumphosphatpuffer und Trinatriumcitrat. Bei negativ geladenen Liganden ist Natriumchlorid ein gutes Stabilisierungsreagenz, ebenso wie Trinatriumcitrat. Es gibt kleine Abweichungen, welche auf die jeweiligen Biomoleküle und deren Struktur und Ladung zurückzuführen sind.

Bezüglich der bifunktionalen Konjugation ist zudem zu beachten, dass für die Anbindung von Liponsäure und dem SA-Peptid an Goldnanopartikel die Partikel zuvor mit Natriumphosphatpuffer oder Natriumchlorid vorbehandelt werden sollten. Die Konjugationseffizienz steigt hierbei deutlich an. Der Konzentrationsbereich sollte bei mindestens 1000 Ladungen/AuNP liegen, was 22,5 μM NaCl entspricht. Bei NaPP sollte der pH-Wert zwischen 6,4 und 7,3 liegen. Für die Anbindung von LNA-Oligonukleotiden hingegen kann am besten NaCl zur Vorbehandlung der Partikel eingesetzt werden, da hier im Vergleich zu NaPP und Trinatriumcitrat bezüglich Beladung und Stabilität ein positiver Effekt auftritt.²⁹

²⁹ Weitere Ergebnisse sind ergänzend in Kapitel 7.8.8. im Anhang zu finden.

4.3. Biologische Anwendungen von multifunktionalen Goldnanopartikel- und Goldnanocluster-Konjugaten

Die vorhergehenden Kapitel befassen sich mit der Beschreibung und Analyse mono- und multifunktionaler Goldnanopartikel-Konjugate. Das Ziel bei der Herstellung dieser Konjugate war es, stabile Kolloide mit verschiedenen funktionsfähigen Liganden zu erhalten. Dies soll im folgenden Kapitel zunächst untersucht werden. Im weiteren Verlauf werden verschiedene Goldnanopartikel-Konjugate, welche sich in ihrer Oberflächenfunktionalisierung und Größe unterscheiden, für unterschiedliche biologische Anwendungen eingesetzt. Es handelt sich hierbei um drei Gebiete. (Abbildung 50) Als erstes werden die Wechselwirkungen von Konjugaten mit Rinderspermien bezüglich ihrer Penetrations- und Hybridisierungsfähigkeit untersucht. Bei der zweiten Anwendung handelt es sich um die Penetration und Transfektion von murinen regulatorischen T-Zellen. In der dritten Anwendung erfolgt die endosomale Aufnahme von Nanopartikel-Agglomeraten in Krebszellen, gefolgt von einer gezielten Freisetzung der Partikel in das Zytoplasma mittels gepulster Laserbestrahlung.

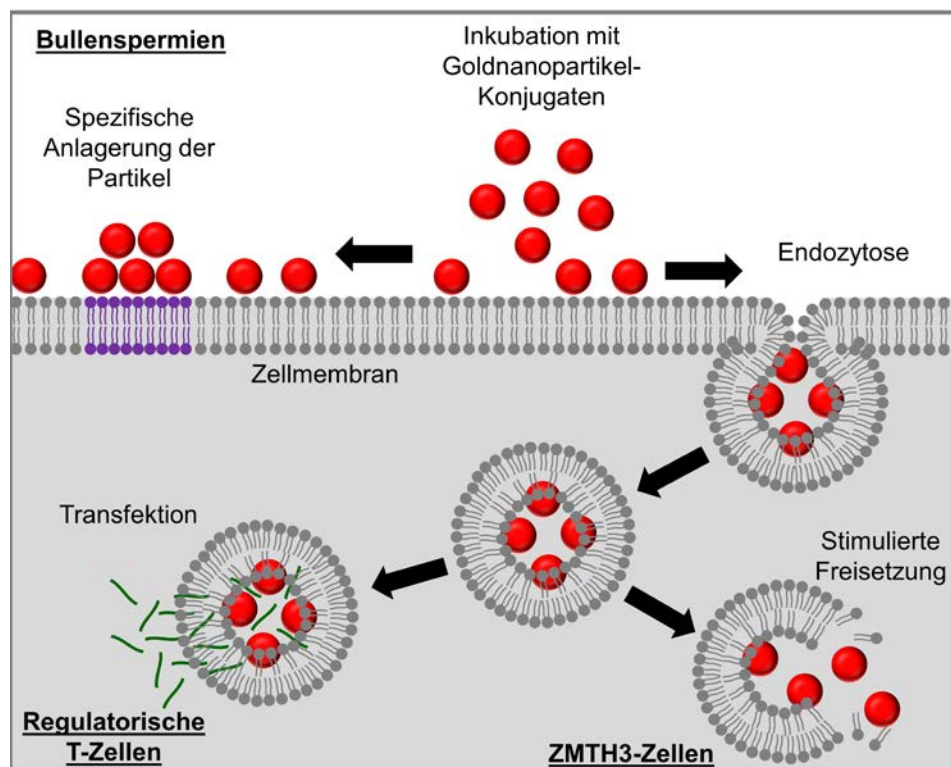


Abbildung 50: Schematische Darstellung der durchgeführten biologischen Experimente.

4.3.1. Auswahlkriterien zum Design der Goldnanopartikel-Biokonjugate für biomedizinische Anwendungen

In den vorhergehend geschilderten Experimenten wird gezeigt, dass die Funktionalisierung von lasergenerierten Goldnanopartikeln mit verschiedenen Liganden wie Salzen, Peptiden und Oligonukleotiden erfolgreich durchführbar ist und zu stabilen Biokonjugaten führt. Aus der Ergebnisdarstellung wird ersichtlich, dass es eine Vielzahl an Kombinationsmöglichkeiten zwischen Nanopartikel und Ligand bezüglich Funktionalisierungsgrad, Stabilität und Agglomerationsgrad gibt. Des Weiteren sind nicht alle Konjugatvarianten für jedes biologische Experiment geeignet. Es ist wichtig, die Konjugate auf die Anwendung anzupassen, um somit einen Effekt und den maximal möglichen Nutzen zu erzielen.

Wie bereits erwähnt, können multifunktionale Goldnanopartikel hergestellt werden. Hierbei können die Konjugate so konzipiert werden, dass die Primärpartikel erhalten bleiben oder Agglomerate entstehen. Abbildung 51 zeigt zwei mögliche Beispiele zur Herstellung von multivalenten Goldnanopartikel-Biokonjugaten, welche für unterschiedliche Anwendungen einsetzbar sind.

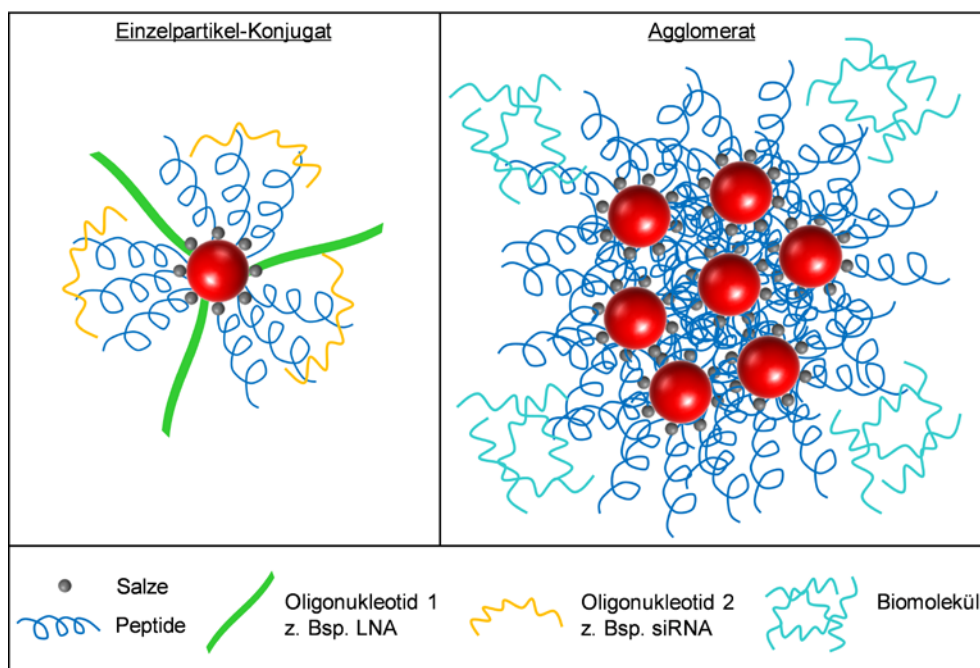


Abbildung 51: Zusammenhang zwischen biologischer Anwendung und Konjugatvarianten: Darstellung von Goldnanopartikel-Konjugaten mit zwei möglichen Oberflächenbedeckungen. Die Verwendung von thiolisierten Oligonukleotiden stabilisiert die Partikel und führt zu Einzelpartikel-Konjugaten. (links) Eine reine Peptidkonjugation führt zur Bildung von Agglomeraten. (rechts) Es können mehrere Liganden in einem Konjugat eingesetzt werden. Beispiele hierfür sind unter den Agglomeraten gezeigt.

Agglomerate sind von Vorteil, wenn die Aufnahme in die Zellen über Endozytose abläuft. [223] Zellen, bei denen keine Endozytose auftritt, so wie es bei Spermien ist [104], sollten vorzugsweise mit einzelnen und somit kleineren Konjugaten inkubiert werden, um durch direkte Translokation in die Zelle zu gelangen. (Abbildung 52) Die Größe ist hierbei ein entscheidender Punkt, da diese die Diffusion, also die Beweglichkeit der Partikel in Membran und Zytoplasma beeinflusst. Neben dem Aufnahmemechanismus müssen auch andere Aspekte wie die Diagnostik oder Therapie berücksichtigt werden. Dies beinhaltet die Lokalisierung der Partikel und das Einschleusen von beispielsweise Medikamenten. Wenn bestimmte Bereiche der Zelle durch die Partikel sichtbar gemacht werden sollen, bietet sich eine Partikelakkumulation an. Diese kann, sofern sie einem Durchmesser von 60 nm [38] entspricht, bereits mit Hilfe eines herkömmlichen Lichtmikroskops detektiert werden. Diese Ansammlung der Partikel kann chemisch über die Anbindung der Konjugate an bestimmte Bereiche, wie die Hybridisierung an das Genom eines Spermiums, erfolgen oder sie kann räumlich durch die Aufnahme in Endosomen erfolgen. Die Therapie kann über die Freisetzung der Nanopartikel selbst oder der Moleküle aus der Ligandenhülle erfolgen.

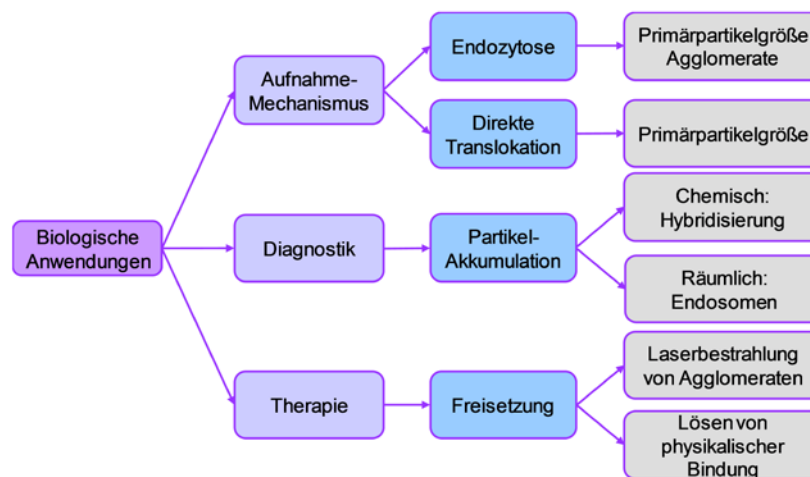


Abbildung 52: Zusammenhang zwischen biologischer Anwendung und Konjugatvarianten: Baumdiagramm zur Analyse des vorliegenden Systems und zur Ermittlung notwendiger Parameter zur Herstellung von AuNP-Konjugaten.

Es ist zu erwähnen, dass es nicht eine universelle Partikelsorte oder ein universelles Biokonjugat gibt, welche für alle biologischen Anwendungen erfolgreich einsetzbar ist. Bei jeder Anwendung muss sorgfältig ermittelt werden, welche Bedingungen vorliegen und was durch den Einsatz der Partikel erreicht werden soll. Anhand dieser Analyse kann anschließend ein Konjugat mit einer bestimmten Zusammensetzung der

Oberflächenbeladung, einer bestimmten Größe, Ladung und Funktion hergestellt werden.

Dieses Vorgehen ist im Folgenden für die Anwendungen, welche in dieser Arbeit eingesetzt werden, exemplarisch beschrieben. Neben den allgemeinen Eigenschaften, welche grundsätzlich jedes Biokonjugat aufweisen sollte, werden spezifische Kriterien bestimmt. Diese müssen zwingend erfüllt werden, damit die Biokonjugate in den entsprechenden Anwendungsfeldern eingesetzt werden können. Die allgemeinen Kriterien umfassen zum einen eine hohe Biokompatibilität der Partikel-Konjugate auf die Zellen. Zum anderen sollen sich die Konjugate im Zellkulturmedium oder dem verwendeten Puffer möglichst nicht verändern und in ihrer Beschaffenheit und Funktionalität stabil bleiben. Die spezifischen Eigenschaften betreffen das Ausmaß der Agglomeration (Einzelpartikel oder Agglomerat), die Partikelkonzentration, die Ligandenmenge auf den Partikeln, das Ausmaß der Funktionalität, die Bindungsstärke der Liganden an die Partikeloberfläche und die Ladung der Konjugate. Außerdem sind die Notwendigkeit der Stabilisierung mittels Proteinen sowie der Freisetzung der Partikel oder Liganden und die Art der Freisetzung zu berücksichtigende Aspekte. (Abbildung 53)

Diese Kriterien wurden, bezogen auf die durchgeführten biomedizinisch anwendungsrelevanten Experimente, eingeordnet, wobei die Bewertungsskala 10 Punkte beinhaltet. Demzufolge ist beispielsweise eine vollständige Agglomeration der Konjugate mit 10 zu bewerten, ebenso wie eine vollständig belegte Partikeloberfläche (Ligandenmenge auf NP) oder die Ladung des Konjugats. Eine kovalente Anbindung der Liganden wird ebenfalls mit 10 bewertet, 0 bedeutet keine Anbindung. Jegliche Art an Abstufungen der Kriterien wird mit Punkten zwischen 0 und 10 bewertet. Dieses Prinzip wird auch für die anderen Kriterien übernommen.

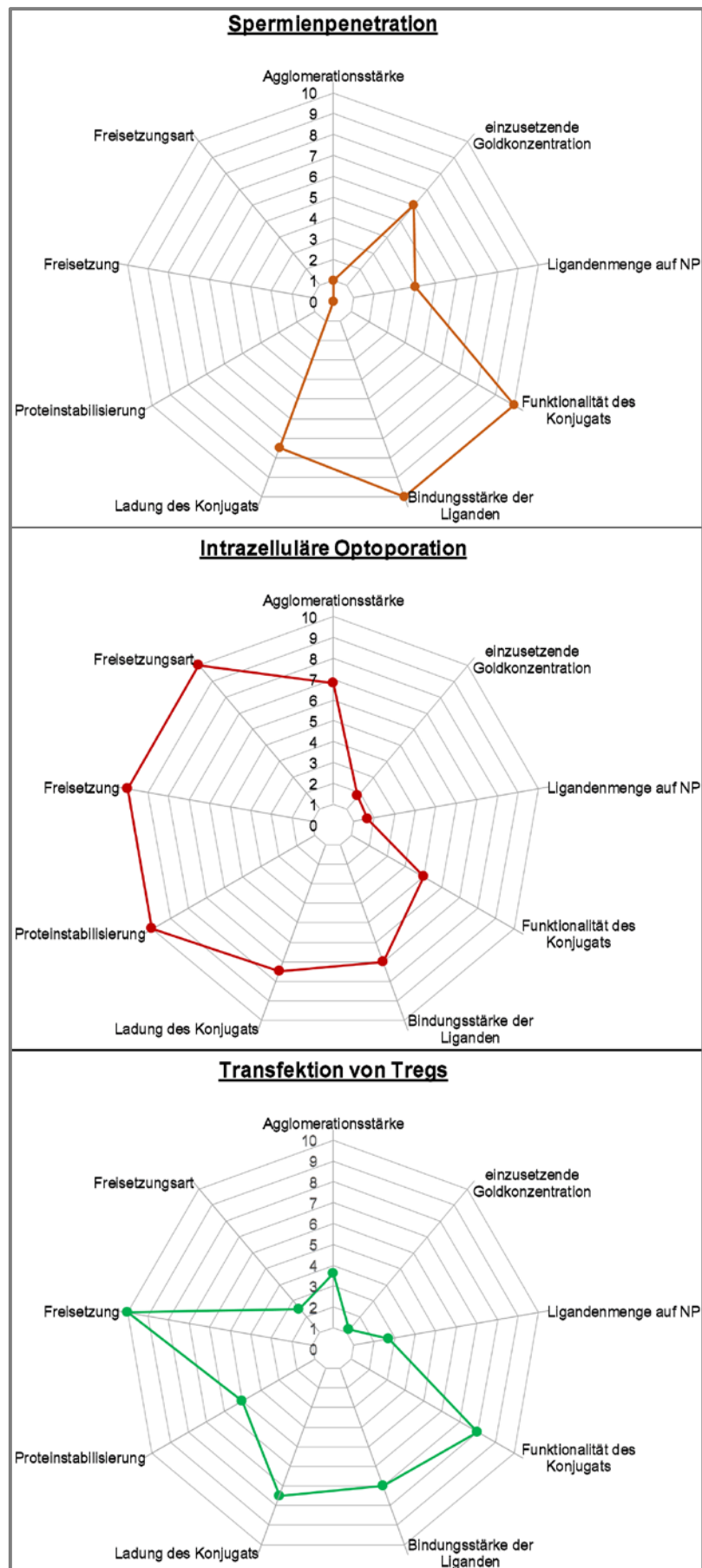


Abbildung 53: Netzdiagramme zur Bewertung der Partikel-Konjugat-Eigenschaften bezüglich der Anwendung mit Bullenspermien, zur Transfektion mit regulatorischen T-Zellen und zur intrazellulären Optoporation.

Bei der *Penetration von Bullenspermien* mit Goldnanopartikel-Biokonjugaten ist eine geringe Agglomeration, also das Vorliegen der Konjugate als Einzelpartikel wichtig. Daneben liegt der Schwerpunkt bei dieser Anwendung vorwiegend auf den eingesetzten Liganden. Sowohl für die Penetration als auch für die Anbindung an das Genom sind funktionelle Liganden, LNA-Sequenzen und zellpenetrierende Peptide, erforderlich. Diese müssen kovalent (Bindungsstärke: 10/10 Punkte) an den Partikeln gebunden sein, damit die Funktionalität der Biokonjugate erhalten bleibt. Es wurde gezeigt, dass Konjugate sowohl mit LNA als auch mit CPPs mit der Membran der Spermienzellen wechselwirken, wodurch die Wichtigkeit der Ladung mit 7,5 von 10 Punkten eingestuft wurde. Eine *Ex-situ*-Stabilisierung der Konjugate mit Proteinen, ebenso wie eine Freisetzung der Partikel ist nicht erforderlich oder erwünscht.

Die *intrazelluläre Optoporation* wird in dieser Arbeit an Krebszellen durchgeführt. Diese nehmen bevorzugt größere Nanopartikelspezies von etwa 60 nm mittels Endozytose auf. Hieraus folgt, dass die Agglomeration der Goldnanopartikel-Biokonjugate stärker (7/10) sein muss. Die Liganden werden in diesem Konstrukt für das Herbeiführen der Agglomeration und der verbesserten Aufnahme verwendet, daher kann die Ligandenmenge bei gleichzeitiger Wirksamkeit gering sein. In diesem Fall ist es auch möglich, dass die Liganden über physikalische Wechselwirkungen gebunden werden. Hierbei stellt insbesondere der Ladungsunterschied zwischen den positiv geladenen Peptidliganden und den negativ geladenen Goldnanopartikeln die Triebkraft der Bindungsbildung dar. Aufgrund der Agglomeration ist eine Proteinstabilisierung notwendig, um das Fortschreiten der Agglomeration bis hin zur Aggregation zu vermeiden. Die Absicht dieser Anwendung ist die gezielte Freisetzung der einzelnen Partikel in das Zytoplasma der Krebszellen. Diesbezüglich wird sowohl die Freisetzung als auch die Art der Freisetzung, welche extern mittels Laserbestrahlung erfolgt, mit 10 von 10 Punkten bewertet.

Die *Transfektion von regulatorischen T-Zellen* liegt mit den Anforderungen an die Goldnanopartikel-Biokonjugate zwischen denen für die Anwendung in Spermien und der intrazellulären Optoporation. In diesem Fall werden auch Konjugate als Einzelpartikel verwendet, allerdings stellt dies hierbei eine geringere Wichtigkeit dar als bei Bullenspermien, da dieser Zelltyp ebenfalls Endozytose durchführt. Der benötigte und in den, im Folgenden dargestellten, Experimenten erfolgreich getestete Konzentrationsbereich ist vergleichbar mit dem für die intrazelluläre Optoporation und liegt bei 1/10 Punkten. Die Menge der Liganden kann gering gehalten werden, weil

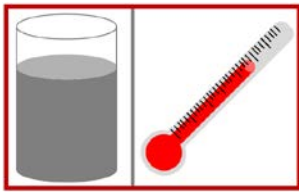
diese hierbei lediglich zur Vorstabilisierung der Partikel und der Zellpenetration benötigt werden. In diesem Fall liegt die Ligandenmenge im notwendigen Bereich. Die Oberflächenliganden (Oligonukleotide und Peptide) müssen kovalent gebunden werden, während funktionelle Substanzen wie siRNA über physikalische Wechselwirkungen an den Konjugaten gebunden werden können. Die Konjugate sollten positiv geladene Bereiche aufweisen, damit eine verbesserte Wechselwirkung mit der funktionellen siRNA und mit der Zellmembran ermöglicht wird. Eine Proteinzugabe im Hinblick auf Stabilisierung ist nicht notwendig. Bezüglich der Zellviabilität wirkt sich dies hingegen förderlich aus. Für die Transfektion ist eine Freisetzung von DNA zwingend notwendig, allerdings wird hierbei kein externer Trigger benötigt. Die physikalisch gebundene DNA kann sich innerhalb der Endosomen von dem Biokonjugat lösen und in das Zytoplasma der Zelle gelangen, um dort wirksam zu werden.

Die hier beschriebenen Anforderungen an die Biokonjugate für die drei verschiedenen Anwendungen soll die Auswahl der entsprechenden Konstrukte erläutern und begründen. Außerdem wird hierbei deutlich, dass verschiedene Aspekte berücksichtigt werden müssen, damit die Biokonjugate auch in den Anwendungen wirkungsvoll genutzt werden können. Schließlich ist anzumerken, dass die für den Einsatz in den verschiedenen Anwendungen ausgewählten Konjugate lediglich eine möglich Variante darstellen. Es sind weitere Varianten möglich, welche ebenfalls potentiell erfolgreich eingesetzt werden können.

4.3.2. Prüfung der Kompatibilität der Konjugate für biologische Anwendungen

Für den Einsatz biologisch relevanter Goldnanopartikel-Konjugate ist es wichtig, dass diese Spezies auch in den Puffern, welche bei diesen Experimenten verwendet werden, stabil sind. Wenn die Konjugate nicht stabil sind und unkontrolliert agglomerieren, so kann nicht mehr sichergestellt werden, dass sie mit den Zellen wechselwirken, eine Partikelaufnahme erfolgt oder ihre Funktionsfähigkeit gegeben ist. In diesem Kapitel sollen die Konjugate auf äußere Einflussfaktoren wie das umgebende Medium und die Temperatur untersucht werden. Weiterhin wird die Funktionsfähigkeit von AuNP-LNA-Sonden erprobt. Hierbei liegt der Schwerpunkt insbesondere auf der Eignung der Konjugate für die Experimente zu den Wechselwirkungen mit Rinderspermien.

4.3.2.1. Stabilität von Goldnanopartikel-LNA-Konjugaten



TRIS-Puffer³⁰, PBS-Puffer⁵ und PBS-Puffer mit 10 mM MgCl₂ sind die Puffer, welche in den durchgeführten biologischen Experimenten verwendet wurden. Folglich wurde die Verträglichkeit dieser Puffer mit den Konjugaten untersucht.

Diese Experimente wurden beispielhaft anhand von 5'LNA_{30T10} durchgeführt. Abbildung 54 A zeigt UV-Vis-Spektren der Konjugate, welche in TRIS-Puffer (oben), PBS-Puffer (mitte) und PBS-Puffer mit 10 mM MgCl₂ (unten) überführt wurden. Die geringste Abweichung vom Spektrum vor der Überführung (rote Linie) zeigen die Konjugate in PBS, was am Primärpartikelindex der Konjugate (Abbildung 54 B) zu erkennen ist. Die größte Abweichung tritt bei der Verwendung von PBS mit 10 mM MgCl₂, nach TRIS-Puffer, auf. Dies kann der Auftragung des PPI gegen die Lagerungszeit entnommen werden. Weiterhin ist zu erkennen, dass bei allen Puffern die Stabilität mit der Zeit abnimmt.

Bei der Verwendung des PBS-Puffers sind die Proben noch nach einer Woche verwendbar, weil hierbei die Stabilität nur um 36% reduziert wird und einen PPI von 16,7 hat. Bei TRIS ist dieser Wert bereits nach vier Tagen erreicht. Konjugate in einer

³⁰ Die Zusammensetzung des TRIS- und PBS-Puffers sind in Kapitel 7.2.3.1 aufgelistet und beschrieben.

Mischung aus PBS und Magnesiumchlorid sollten unmittelbar nach dem Überführen in den Puffer verwendet werden. Die Destabilisierung der Konjugate in einer Pufferlösung entspricht der Erwartung. Der PBS-Puffer enthält NaCl, KCl und Phosphatpuffer. Die gesamte Salzkonzentration dieses Puffers beträgt 150 mM. Die positiven Ladungen in dem Puffer lagern sich an der Partikeloberfläche und den gebundenen LNA-Liganden an, wodurch die Abstoßung zwischen den Partikeln verringert wird. [16, 97] Aufgrund der Tatsache, dass die Salzkonzentration in der Größenordnung der bei der Konjugation verwendeten Konzentration (Kapitel 4.2.4) liegt, erfolgt hierbei nur eine geringe Destabilisierung (= -36%) der Konjugate. Die drastische Reduktion der Stabilität in Anwesenheit von MgCl_2 ist auf die zweiwertigen Magnesium-Kationen zurückzuführen. Dies basiert auf der Schulze-Hardy-Regel, welche die empirische Ermittlung der kritischen Koagulationskonzentration von hydrophoben Kolloiden beschreibt. Je höher die Elektrolytkonzentration, desto schneller fallen die Partikel aus. Dies ist ausgeprägter für höherwertige Ionen und steht für einwertige, zweiwertige und dreiwertige Kationen in einem Verhältnis von 100:1,3:0,07. [216]

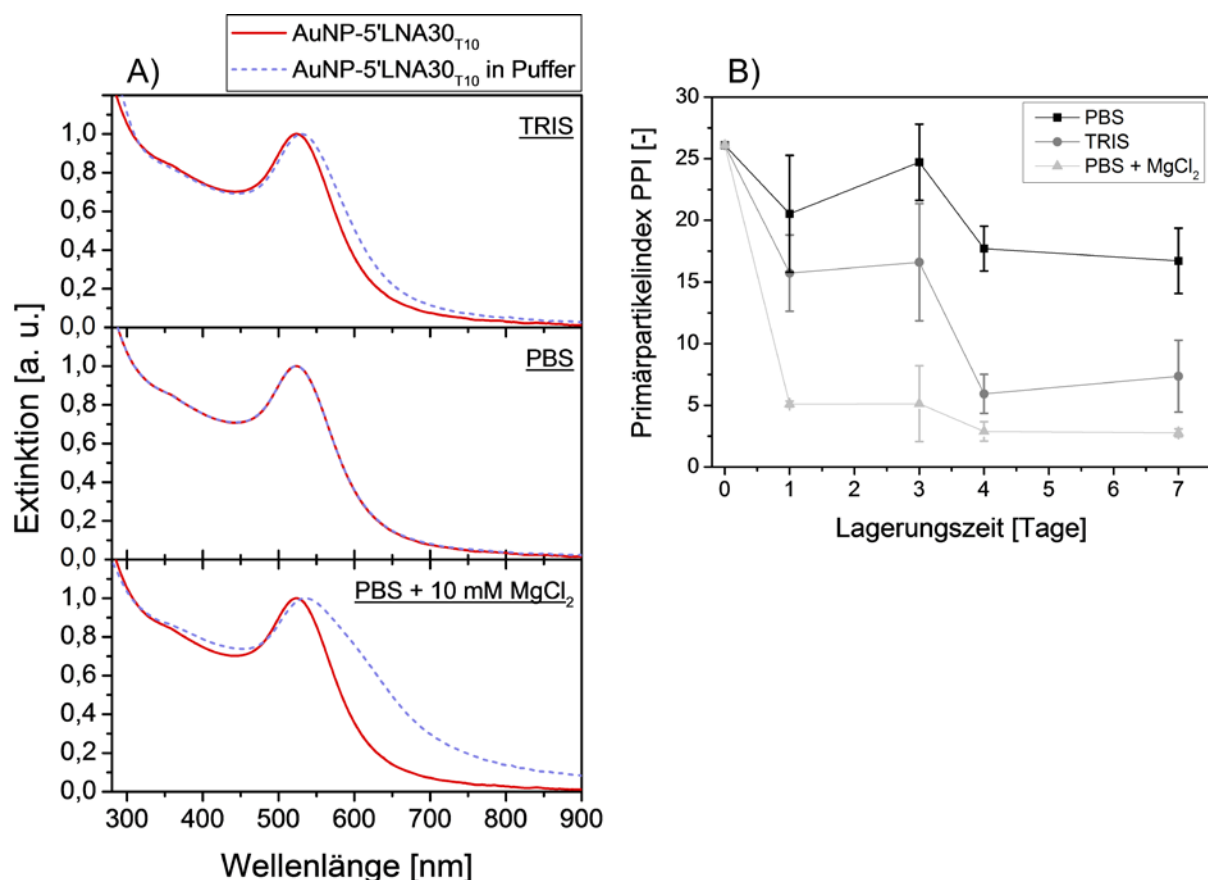


Abbildung 54: Stabilität von AuNP-5'LNA30_{T10} in verschiedenen Puffern. Darstellung von UV-Vis-Spektren der Konjugate in TRIS (oben), PBS (mitte) und PBS mit 10 mM MgCl_2 (unten). (A) Primärpartikelindex der Konjugate in den genannten Puffern in Abhängigkeit der Lagerungszeit. (B)

Die Destabilisierung von AuNP-Oligonukleotid-Konjugaten in TRIS-Puffer wurde bereits durch U. Taylor et al. beschrieben. [111] Hierbei wurde die Destabilisierung durch die Existenz von Chlorid-Ionen erklärt. In diesem Fall kann die Erklärung durch die Anlagerung von protonierten Amino-Gruppen des Tris-hydroxyaminomethans [16] und des Gentamicinsulfats an die Nanopartikel erfolgen. Sie können eine zweite Ligandenhülle um die Nanopartikel bilden und dadurch die elektrostatische Stabilisierung behindern.

Weiterhin wurde der Einfluss der Temperatur auf die AuNP-5'LNA30_{T10}-Konjugate untersucht, weil die Analyse der Hybridisierungsfähigkeit von Nanopartikel-LNA-Konjugaten durch Erhitzen und Abkühlen in einem Temperaturbereich zwischen 20°C und 90°C erfolgt. Die untersuchten Parameter waren die Goldkonzentration, die Verschiebung des SPR-Peaks und der hydrodynamische Partikeldurchmesser.

Der Einfluss der Temperatur auf die Nanopartikel-Konjugate kann als vernachlässigbar angesehen werden. Sowohl das Aufheizen der Proben auf 80°C als auch das darauffolgende Abkühlen der Proben auf 20°C hat keine Veränderungen zur Folge. (Abbildung 55 A) Das Konjugat mit der höchsten Menge an NaCl von 0,5 mol/L, welches bei der Konjugation der LNA verwendet wurde, zeigt bei der Temperaturerhöhung zwischen 35°C und 74,4°C einen Anstieg von 31,1 µg/mL auf 42,0 µg/mL. Dies kann als Ausreißer betrachtet werden, weil es die einzige Auffälligkeit bei dieser Messung ist. Die Betrachtung der SPR-Verschiebung der Konjugate in diesem Experiment (Abbildung 55 B) lässt für die mit NaCl behandelten Partikel (0,05-0,5 M) keine Veränderungen der Probe vermuten, weil die zu erkennenden Schwankungen in dem Verlauf der Daten maximal 1 nm betragen. Unter Berücksichtigung der Genauigkeit des Messgerätes von ±0,8 nm sind diese Schwankungen demnach zu vernachlässigen.

Bei einer Temperatur-Erhöhung der Probe ohne Natriumchlorid (schwarze Punkte im Diagramm) tritt eine größere Verschiebung von +3 nm auf. Dies kann darauf zurückzuführen sein, dass die Beladung an LNA gering ist und demnach die Partikel weniger gut stabilisiert sind. Die Partikel können durch die verstärkte Bewegung aufgrund der erhöhten Temperatur agglomerieren. Alle anderen Proben können als temperaturstabil betrachtet werden.

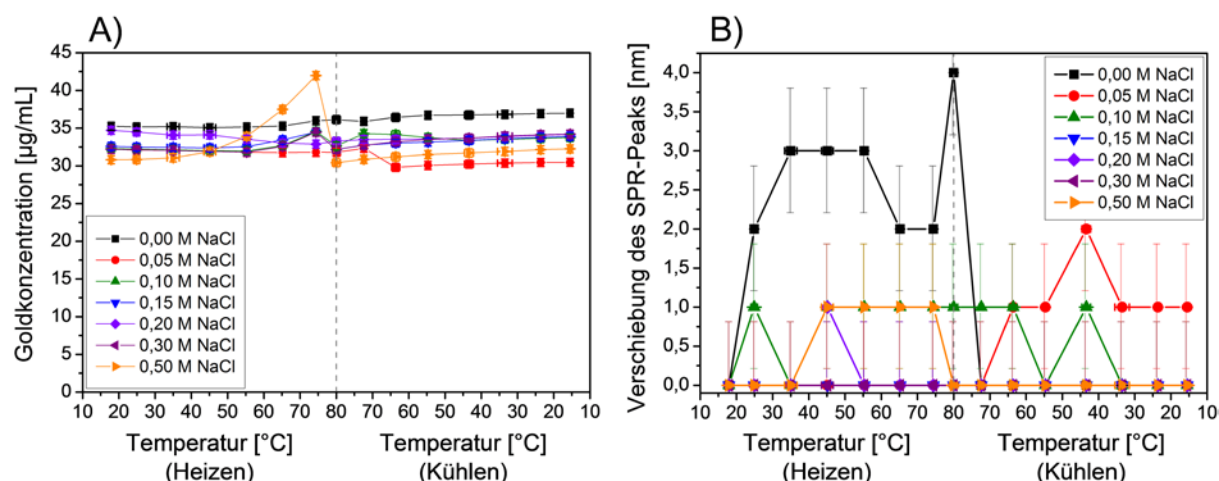


Abbildung 55: Einfluss der Temperatur auf AuNP-LNA-Konjugate. Darstellung der Goldkonzentration (A) und der Verschiebung des SPR-Peaks (B) abhängig von der Temperatur. Es wurden Konjugate mit unterschiedlichen Mengen an Natriumchlorid während der Konjugation untersucht.

In der Analyse der Partikelgröße (DLS) bei erhöhter Temperatur wurde die Darstellung der mittleren Durchmesser aus der Volumenverteilung bevorzugt, um eventuell auftretende Agglomerationseffekte besser zu erkennen und deuten zu können. Die Ergebnisse hierzu sind in Abbildung 56 A dargestellt. Es ist zu erkennen, dass die Größe der Konjugate zu Beginn der Messung unterschiedlich ist und mit steigender Salzkonzentration von 12,0 nm auf 14,1 nm wächst. Dies deutet auf die unterschiedlichen Beladungsmengen der Partikel, welche zwischen $5,3 \pm 0,3$ und $8,8 \pm 3,4$ LNA/AuNP liegen, hin. [86] Die Analyse des Einflusses der Salzkonzentration auf die Konjugationseffizienz und die Ligandenanordnung wurde bereits in Kapitel 4.2.4 erörtert. Während des Erwärmens und Abkühlens der Proben sind bei allen Proben Schwankungen von maximal 22% um den Anfangswert (Abbildung 56 B) zu erkennen, weshalb die Größe der Konjugate als stabil in Bezug auf die Temperaturänderung zwischen 20°C und 80°C angesehen werden kann. Im Vergleich zu den hierbei verwendeten LNA-konjugierten Partikeln, unterliegen ligandenfreie lasergenerierte Goldnanopartikel einer reversiblen Änderung des hydrodynamischen Durchmessers und des SPR-Peaks, was aufgrund einer temperaturinduzierten Agglomeration zustande kommt. [217] In dem vorliegenden Experiment schützen die gebundenen Liganden die Nanopartikel vor einer temporären Agglomeration aufgrund einer erhöhten Kollisionswahrscheinlichkeit.

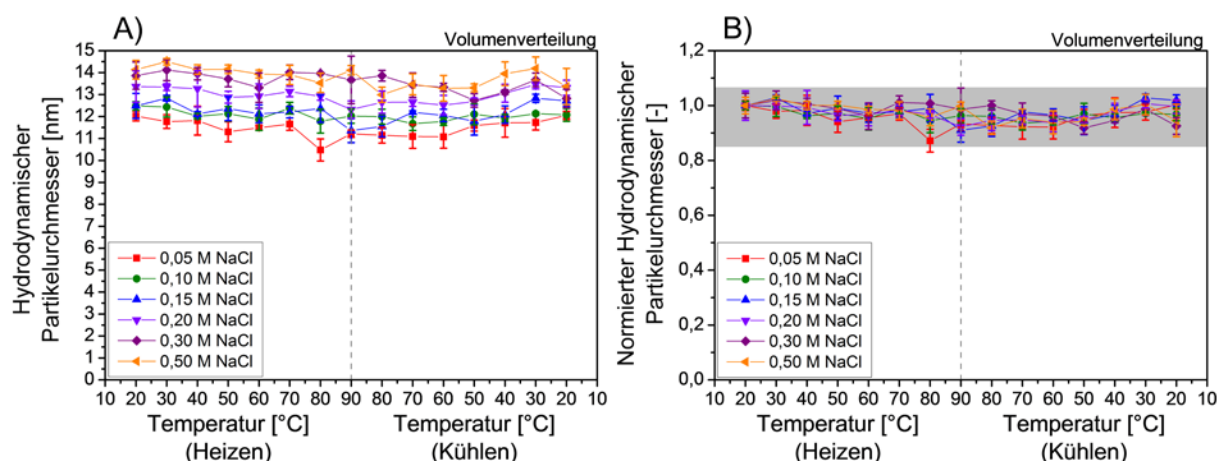
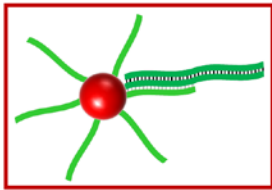


Abbildung 56: Einfluss der Temperatur auf AuNP-LNA-Konjugate. Darstellung des hydrodynamischen Partikeldurchmessers der Konjugate in Abhängigkeit der Temperatur. Es wurden Konjugate mit unterschiedlichen Mengen an Natriumchlorid während der Konjugation untersucht. (A) Darstellung des hydrodynamischen Partikeldurchmessers normiert auf den Anfangswert bei 20°C vor dem Erhitzen der Probe in Abhängigkeit der Temperatur. (B)

Zusammenfassend gilt, dass AuNP-LNA-Konjugate in PBS-Puffer am stabilsten sind und bis zu einer Woche ohne signifikante Änderungen der Konjugateigenschaften gelagert werden können. Die Verwendung der Konjugate in TRIS-Puffer ist bis zu vier Tage möglich. Wird eine Mischung aus PBS und Magnesiumchlorid verwendet, sollten die Proben optimalerweise unmittelbar nach dem Überführen der Konjugate in den Puffer verwendet werden. Die Untersuchung des Temperatur-Einflusses auf AuNP-LNA-Konjugate hat gezeigt, dass diese bis zu einer Temperatur von 80°C stabil sind und keine Veränderungen aufweisen. Demnach können diese Proben uneingeschränkt für biologische Experimente eingesetzt werden.³¹

³¹ Weitere Ergebnisse sind ergänzend in Kapitel 7.8.9. im Anhang zu finden.

4.3.2.2. Hybridisierung von AuNP-LNA-Konjugaten an synthetische ssDNA und dsDNA-Proben



Die hergestellten Goldnanopartikel-LNA-Konjugate sollen unter anderem für die Markierung Y-Chromosom-tragender Spermien verwendet werden. Hierfür sollen diese Spezies nach Eintritt in den Zellkern der Zellen an die genomische DNA hybridisieren.

Bei diesem Experiment gibt es eine Vielzahl von Einflussfaktoren, daher wurde die Eigenschaft der AuNP-LNA-Sonden an DNA zu binden zunächst außerhalb der Zelle an synthetischer dsDNA untersucht. Hierbei wurde der Einfluss der Nanopartikel und des ebenfalls bei dem biologischen Experiment anwesenden zellpenetrierenden Peptids untersucht. Die im Folgenden aufgeführten Experimente erfolgten im Rahmen eines DFG-geförderten Kooperationsprojektes mit dem Friedrich-Loeffler-Institut in Mariensee.³² Ein Teil der synthetischen dsDNA wurde von Dr. Roberto Mancini hergestellt und für die Experimente zur Verfügung gestellt. Des Weiteren wurden Teile dieses Kapitels in einer Publikation verarbeitet und bei dem Journal *Analyst* veröffentlicht.³³ [276]

Bei der Beschreibung der Ergebnisse im Folgenden bedeutet die Schmelztemperatur des Duplex die Temperatur, bei der 50% des Doppelstrangs voneinander getrennt vorliegt. Dies ist der Vorgang der Denaturierung. [218, 219] Die Schmelztemperatur des Triplex hingegen soll das Abtrennen der LNA von dem Doppelstrang bezeichnen. Dies erfolgt im Allgemeinen zuerst, weshalb diese Schmelztemperatur geringer ist als die des Duplex. [220]

Anhand der Sequenz 5'LNA10 wurde der Einfluss der Menge an LNA pro dsDNA in Anwesenheit von Goldnanopartikeln untersucht. Das Verhältnis wurde von 0,5 bis 2,2 LNA-Moleküle pro dsDNA variiert. (Abbildung 57 A) Es ist zu erkennen, dass die Schmelztemperaturen sowohl für den Duplex als auch für den Triplex mit steigender Menge an LNA pro dsDNA steigen. Weiterhin vergrößert sich der Abstand zwischen $T_m(\text{Duplex})$ und $T_m(\text{Triplex})$ je mehr LNA-Liganden vorhanden sind. Ein Ausreißer für

³² Friedrich-Loeffler-Institut (Mariensee), Institut für Nutztiergenetik; Leitung: Prof. Dr. Detlef Rath

³³ Gamrad, L.; Mancini, R.; Werner, D.; Tiedemann, D.; Taylor, U.; Ziefus, A.; Rehbock, C.; Klein, S.; Kues, W.; Barcikowski, S.; Rath, D.; Triplex-hybridizing bioconjugated gold nanoparticles for specific Y-chromosome sequence targeting of bull spermatozoa. *Analyst*, **2017**, akzeptiertes Manuskript, <http://dx.doi.org/10.1039/C6AN02461K>.

T_m (Triplex) liegt bei 0,7 LNA/dsDNA vor. Der Grund für dieses Verhalten liegt vermutlich darin, dass bei einer geringen Menge an LNA pro dsDNA unter 1 nicht genügend LNA-Moleküle vorliegen, um alle Doppelstränge in der Probe zu stabilisieren. Die beiden Schmelztemperaturen liegen daher dicht beieinander. Bei einem Überschuss an LNA gegenüber der dsDNA wird die Hybridisierungseffizienz zwar geringer, aber die absolute Menge an erfolgten Hybridisierungen steigt an. Dadurch werden mehr Doppelstränge durch die LNA stabilisiert, dies ist an der erhöhten Schmelztemperatur zu erkennen. [133, 134, 137] Die T_m (Triplex) steigt ebenfalls, weil auch hierbei die Stabilisierung auftritt, jedoch in einem geringeren Ausmaß. Weiterhin bedeutet eine größere Menge an LNA eine um den gleichen Faktor größere Menge an Goldnanopartikeln, welche ebenfalls einen stabilisierenden Effekt auf die Triplex-Bildung ausübt. [136, 211] Dieser kann somit verstärkt werden, worauf jedoch erst im weiteren Verlauf des Kapitels näher eingegangen werden soll.

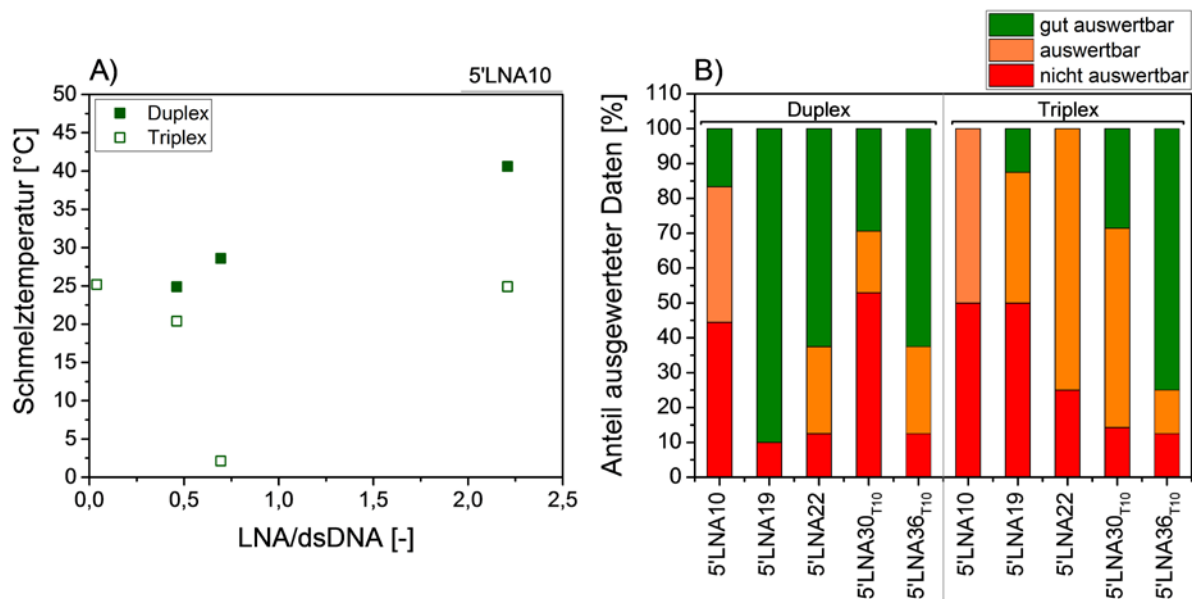


Abbildung 57: Darstellung der Schmelztemperatur des Duplex und Triplex von AuNP-5'LNA10 zur Ermittlung des Einflusses der Menge an LNA-Liganden pro dsDNA auf die Hybridisierung. (A) Darstellung der Menge an auswertbaren Experimenten für vier verschiedene Sequenzen. (B)

Bei der Analyse der Duplex- und Triplex-Hybridisierung wurde eine Vielzahl an Experimenten durchgeführt, welche zum Teil nicht auswertbar waren. Es erfolgte eine Zusammenstellung dieser Daten, um eine Aussage über die Reproduzierbarkeit machen zu können. (Abbildung 57 B) Die Untersuchung von AuNP-LNA-dsDNA-Hybriden auf Basis Y-Chromosom-spezifischer Sequenzen kann nicht als reproduzierbar bewertet werden. Die Analyse wird mittels temperaturabhängiger UV-Vis-Spektroskopie verfolgt und durch die Auswertung der Extinktionswerte beim DNA-Peak von 260 nm bewertet. Der Verlauf der Extinktion in Abhängigkeit der Temperatur

ergibt in der Regel einen sigmoidalen [211, 219] Verlauf für das Vorliegen eines Doppelstrangs, welcher einen Übergang anzeigt, und einen bisigmoidalen Verlauf für einen Triplex, der zwei Übergänge bei der Denaturierung indiziert [218]. Es wurden in dieser Arbeit insgesamt 141 Proben mit fünf verschiedenen Sequenzen vermessen, hiervon waren 28% nicht auswertbar, 29% auswertbar und 43% gut auswertbar. Die Klassifizierung erfolgte anhand der Güte der Anpassung mit Hilfe eines sigmoidalen oder bisigmoidalen Fits. Demnach waren Messungen „nicht auswertbar“, wenn die Daten nicht angepasst werden konnten und keinen sigmoidalen oder bisigmoidalen Verlauf aufwiesen. „Gut auszuwerten“ waren alle Messungen, deren Anpassung eine Güte von über 90% aufwies. Anpassungen mit einer geringeren Güte waren demzufolge lediglich „auswertbar“. Weniger als die Hälfte aller Proben waren gut auszuwerten, da sie bei der Analyse eine Korrelation der Anpassungen von mindestens 0,9 ergaben. Dies zeigt die schlechte Reproduzierbarkeit dieses Experiments. Hierbei ist anzumerken, dass dies auch der Grund für teilweise nicht angeführte Fehlerbalken ist. Bei nicht auswertbaren Messdaten konnten die Messreihen nicht mit in die Auswertung eingebunden werden.

Abbildung 57 B zeigt eine Aufsplittung dieser Angabe auf die einzelnen verwendeten Sequenzen für Duplex und Triplex-Proben. Generell sind die Duplex-Proben besser auszuwerten. Der Grund hierfür kann sein, dass die Denaturierung, ebenso wie die Hybridisierung, der LNA zu einem Triplex 100- bis 1000-fach langsamer verläuft als bei dem Duplex. Dies führt zu einer Über- und Unterschätzung der Schmelztemperatur. [218] Demzufolge resultieren vermehrt Abweichungen in den Messdaten.

Weiterhin lassen die Daten vermuten, dass eine Analyse des Duplex mit steigender Sequenzlänge erschwert wird und die Analyse des Triplex hingegen erleichtert. Dies kann einerseits daran liegen, dass es bei längeren Sequenzen keine eindeutige Auftrennung ausgehend von einer Position gibt, sondern an mehreren Stellen auf dem Doppelstrang eine Denaturierung stattfindet. Beim Triplex hingegen stabilisiert die LNA den Duplex, weshalb diese schwächer hybridisiert und dadurch einfacher denaturiert.

Im Folgenden wird das Hybridisierungsverhalten verschiedener Sequenzen in Anwesenheit von Goldnanopartikeln und eines weiteren funktionalen Liganden untersucht. Abbildung 58 zeigt die Schmelztemperatur des Duplex und Triplex für

verschiedene Proben. Es ist zu erkennen, dass die Schmelztemperatur des Duplex mit steigender Anzahl an Basen von $32,8 \pm 17,6^\circ\text{C}$ für 10 Basenpaare bis $67,6 \pm 6,6^\circ\text{C}$ für 22 Basenpaare steigt. Dies ist für die dsDNA der Sequenzen von 5'LNA10, 5'LNA19 und 5'LNA22 zu beobachten. Die Schmelztemperaturen der dsDNA der anderen drei Sequenzen liegen unter Berücksichtigung des Fehlers und der Annahme eines nichtlinearen Zusammenhangs ebenfalls in dieser Reihe. Hierbei ist zu erwähnen, dass die Anzahl an Basen der dsDNA bei 18 (dsDNA der 5'LNA36_{T10}) und 20 (dsDNA der 5'LNA30_{T10}) liegt. Der Grund für diese Beobachtung liegt darin, dass die Schmelztemperatur ein Wert für die 50%-ige Denaturierung eines Doppelstrangs ist. Bei kurzen Sequenzen mit 10 Basenpaaren genügt es, wenn nur 5 Basenpaare voneinander getrennt vorliegen. Ist die Sequenz doppelt so lang, müssen 10 Basenpaare voneinander getrennt werden, wofür eine höhere Temperatur erforderlich ist. [221, 222]

Die Hybridisierung einer LNA an einen passenden DNA-Doppelstrang führt in allen Fällen, außer bei der Sequenz mit 10 Basen, zu einer Erhöhung der Schmelztemperatur des Duplex auf $55,5 \pm 2,1^\circ\text{C}$ (5'LNA36_{T10}) und $63,3 \pm 0,6^\circ\text{C}$ (5'LNA30_{T10}). Das bedeutet, dass die LNA, welche als erstes denaturiert wird, das System stabilisiert. [133, 134, 137] Hierbei ist eine Abhängigkeit von der Sequenzlänge zu beobachten. Die Schmelztemperatur des Triplex liegt erwartungsgemäß jeweils unterhalb der T_m des Duplex.

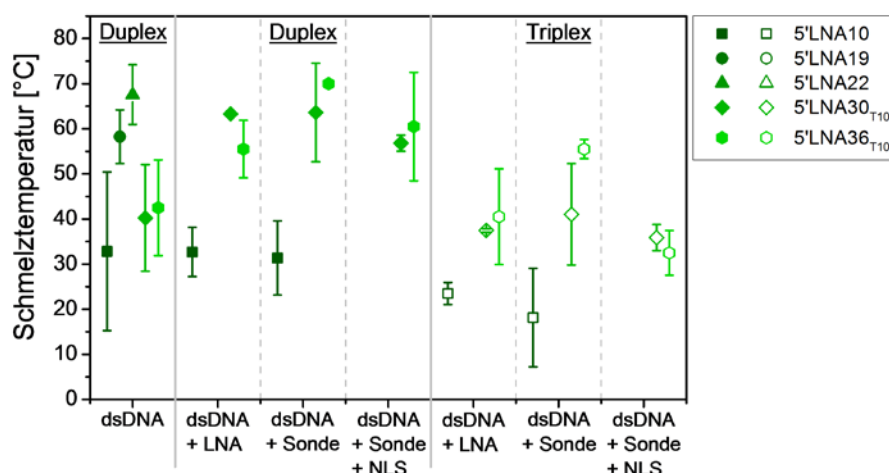


Abbildung 58: Darstellung der Schmelztemperatur des Duplex und Triplex verschiedener LNA-Sequenzen mit und ohne Goldnanopartikel und zur Ermittlung des Einflusses eines NLS_{Cys}-Peptids auf die Hybridisierung. Teile der Ergebnisse stammen aus [276].³⁴

³⁴ Lisa Gamrad, Roberto Mancini, Daniel Werner, Daniela Tiedemann, Ulrike Taylor, Anna Zieffuß, Christoph Rehbock, Sabine Klein, Wilfried Kues, Stephan Barcikowski and Detlef Rath. Triplex-hybridizing bioconjugated gold nanoparticles for specific Y-chromosome sequence targeting of bull spermatozoa. Analyst, 2017, Accepted Manuscript. <http://dx.doi.org/10.1039/C6AN02461K>. Reproduced by permission of The Royal Society of Chemistry.

Die Anwesenheit von Goldnanopartikeln, an denen die LNA kovalent gebunden ist, hat einen Einfluss auf das System. Dies kann bezüglich des Duplex lediglich bei 5'LNA36_{T10} gesehen werden. Hierbei steigt T_m um 14,5°C bei Anbindung der LNA an Goldnanopartikel. Die Stabilisierung des Duplex erfolgt hierbei durch einen synergistischen Effekt zwischen den Goldnanopartikeln und der LNA aufgrund des hohen Dielektrikums zwischen den Partikeln. [136, 211]

Beim Triplex denaturiert die LNA in Anwesenheit der Goldnanopartikel (= Sonde) bei 10 Basenpaaren bei einer geringeren Temperatur von 18,1±10,9°C. Eine mögliche Erklärung für diese Destabilisierung liegt in der Sequenz. Hier wurde kein Abstandhalter zwischen der Thiol-Gruppe und der Sequenz verwendet, wodurch sich der Nanopartikel dicht an der dsDNA befindet. Durch die Hybridisierung des Partikels mit anderen dsDNA bildet sich ein enges Netzwerk, welches leicht aufgebrochen werden kann. Die Werte für 5'LNA30_{T10} und 5'LNA36_{T10} weisen jeweils eine Erhöhung der T_m (Triplex) auf, was wie bei dem Duplex auf eine Stabilisierung hindeutet. Für die letztere Sequenz ist dies stärker ausgeprägt. Bei der Erklärung des Unterschieds zwischen den Sequenzen kann die Erhöhung der Schmelztemperatur durch Fehlanpassungen (engl.: mismatch) [136] in der Hybridisierung ausgeschlossen werden, weil die Doppelstrang-DNA so ausgewählt wurde, dass keine Fehlanpassungen auftreten. Die Abhängigkeit der T_m von der Sequenzlänge, wie sie bereits für den Duplex bekannt ist, kann hierbei ebenfalls als Erklärung herangezogen werden.

Die Verwendung eines zweiten Liganden neben der LNA auf dem Goldnanopartikel während einer Triplex-Hybridisierung, hierbei ein thiolisiertes NLS_{Cys}-Peptid, hat einen stärkeren Einfluss auf die Hybridisierung. Sowohl bei den Schmelzpunkten des Duplex als auch bei denen des Triplex ist eine Reduktion durch die Gegenwart des Peptids zu verzeichnen. Beim Duplex liegt die Verringerung der T_m bei 10,7% (5'LNA30_{T10}) und 13,6% (5'LNA36_{T10}), wohingegen die T_m (Triplex) um 12,4% (5'LNA30_{T10}) und 41,4% (5'LNA36_{T10}) aufgrund des NLS_{Cys} sinkt. Die Hybridisierung der LNA an die Doppelstränge kann dadurch geschwächt sein, dass in ihrer unmittelbaren Umgebung mehr Liganden sind und somit nicht ausreichend Platz für die Anbindung besteht. In diesem Fall ist es vorteilhaft, einen Abstandhalter zwischen der Thiol-Gruppe und der Sequenz zu verwenden. [16]

Die geometrische Anordnung als Konjugat mit und ohne NLS_{Cys}-Peptid und in hybridisierter Form mit einer dsDNA wurde anhand der Konjugate mit 5'LNA₃₆T10 mittels TEM und DLS untersucht. Aus den TEM- und DLS-Messungen geht hervor, dass die Größe der AuNP-5'LNA₃₆T10-Konjugate im gleichen Größenbereich von $7,4 \pm 1,6$ nm (TEM) und $6,6 \pm 1,2$ nm (DLS) wie die Nanopartikel ohne Liganden liegt. (Abbildung 59) Die DLS-Messungen zeigen, dass der mittlere hydrodynamische Partikeldurchmesser bei den Proben mit NLS_{Cys}-Peptid jeweils sinkt und die Hybride kleiner zu sein scheinen als die nicht hybridisierten Konjugate. Dies kann damit erklärt werden, dass das NLS_{Cys}-Peptid durch die gegensätzliche Ladung von dem Konjugat und im Fall der hybridisierten Proben auch von der Doppelstrang-DNA angezogen wird. Somit greift das Peptid in die geordnete Struktur der Hybride und der LNA-Liganden auf der Partikeloberfläche ein. Dadurch kann sich einerseits die Anordnung der Liganden und Doppelstrang-DNA ändern, andererseits liegen die Liganden vermutlich dichter auf den Partikeln. Anzumerken ist hierbei, dass der Unterschied nicht signifikant ist, jedoch ist eine Tendenz erkennbar.

Aus den TEM-Messungen geht hervor, dass die Partikel eine vergleichbare Größe haben wie die Ausgangspartikel. Der Interpartikelabstand der reinen AuNP-5'LNA₃₆T10-Konjugate liegt bei $4,9 \pm 4,6$ nm. Dies zeigt, dass die Nanopartikel zu einem großen Teil vereinzelt vorliegen und keine Agglomerate bilden. Weiterhin weist die Standardabweichung dieses Wertes darauf hin, dass die Nanopartikel unregelmäßig angeordnet sind. Dies ist ebenfalls ein Zeichen für eine gute Kolloidstabilität. Die Interpartikelabstände für die Konjugate mit Peptid und für die hybridisierte Probe zeigen einen Interpartikelabstand von $2,6 \pm 1,6$ nm und $2,6 \pm 1,7$ nm, dies weist auf eine engere Anordnung der Partikel hin.

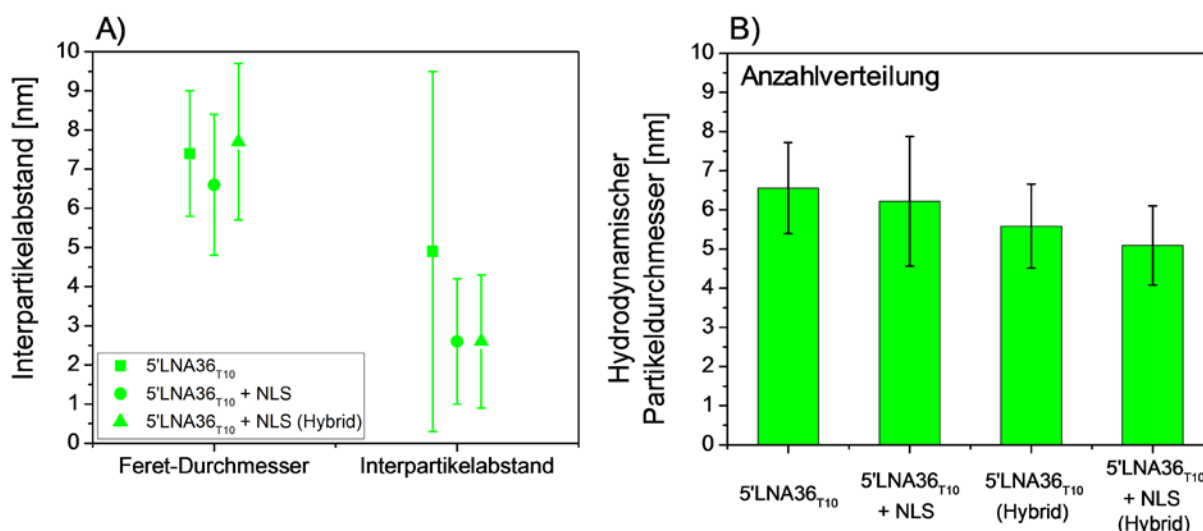


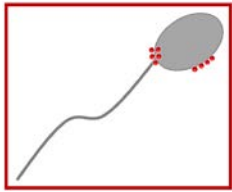
Abbildung 59: Darstellung des hydrodynamischen Partikeldurchmessers (B), des Feret-Durchmessers und der Interpartikelabstände von AuNP-5'LNA36_{T10}-Konjugaten (A) mit und ohne NLS_{Cys}-Peptid sowie als Hybrid mit dsDNA.

Bei den Konjugaten kann dies auf das Peptid, welches die Ladung zwischen den Partikeln verringert und hierdurch die Abstoßung und Interpartikelabstände reduziert [72, 223], zurückgeführt werden. Bei den Hybriden liegt die Reduktion des Interpartikelabstandes an der erfolgten Hybridisierung, bei der mehrere doppelsträngige DNA-Moleküle an einem Goldnanopartikel binden können und dies somit zu einer Verbrückung und damit zu einer Annäherung der Partikel führt. [43, 44, 211, 220]

Zusammenfassend kann aus diesen Experimenten entnommen werden, dass die Analyse von Duplex- und Triplex-Hybridisierungen mittels UV-Vis-Spektroskopie eine geringe Reproduzierbarkeit aufweist, weil nur 43% aller durchgeführten Analysen eine gute Auswertung ermöglichen. Des Weiteren werden Triplex-Strukturen mit einem Überschuss an LNA pro DNA-Doppelstrang besser stabilisiert und werden daher für eine Analyse empfohlen. Goldnanopartikel stabilisieren die Bildung des Triplex in seiner Hybridisierung, während die zusätzliche Existenz eines positiv geladenen Peptids den Triplex destabilisiert. Schließlich ist die Reduktion der Interpartikelabstände eine Folge von Ladungsausgleich durch den zweiten Liganden (NLS) und der erfolgten Hybridisierung.³⁵

³⁵ Weitere Ergebnisse sind ergänzend in Kapitel 7.8.10. im Anhang zu finden.

4.3.3. Analyse der Wechselwirkungen von Goldnanopartikel-Konjugaten mit Rinderspermien



Die Membran von Spermien stellt bei dem Einbringen von Nanopartikeln in diese Zelle eine schwer zu durchdringende Barriere dar. Bereits veröffentlichte Experimente zur Wechselwirkung der Partikel mit Rinderspermien beinhalten AuNP-Konjugate aus Oligonukleotiden und Peptiden. [39, 111, 224] Hierbei wurde sich hauptsächlich auf monofunktionale und bifunktionale Konjugate mit Oligonukleotiden und Peptiden beschränkt. Es wurde dabei herausgefunden, dass die Penetration der Partikel in die Spermien unter anderem von dem Zustand der Spermienmembran abhängt. [151] Ein entscheidender Aspekt ist hierbei die Akrosomreaktion, welche spontan abläuft und dazu führt, dass die Spermienmembran fluider wird und schließlich eine Befruchtungsunfähigkeit der Spermien zur Folge hat. Bei akrosomreagierten Spermien sind vermehrt Oligonukleotid-Nanopartikel zwischen der Kernhülle und der postakrosomalen Hülle (untere Spermienkopfhälfte) gefunden worden. Dies war der Fall sowohl für monofunktionale als auch für bifunktionale Konjugate. Eine besonders starke Anlagerung wurde in Anwesenheit des amphiphilen NLS_{Cys}-Peptids gefunden. [151]

Diese Erkenntnisse wurden sich für die vorliegende Arbeit zu Nutze gemacht, um die Penetration von Goldnanopartikel-Konjugaten in intakte Spermien zu ermöglichen. Hierzu wurden weitere Variationen der Oberflächenliganden getestet und in dem folgenden Kapitel dargestellt. Es wurden zudem Wechselwirkungen abhängig von der Membranstruktur ermittelt. Im zweiten Teil dieses Kapitels wird die Hybridisierung von ausgewählten Konjugaten mit biologischen Proben wie genomischer DNA in freier und kondensierter Form (demembralisierte Spermienköpfe) thematisiert.

Die in diesem Kapitel beschriebenen Experimente wurden in Kooperation mit dem Institut für Nutztiergenetik des Friedrich-Loeffler-Instituts Mariensee (Prof. Rath et al.) durchgeführt. Die Herstellung und Charakterisierung der verwendeten Konjugate wurden von mir durchgeführt, ebenso wie UV-Vis-spektrometrische Untersuchungen, konfokalmikroskopische Analysen, Messungen der Fluoreszenzlebensdauer und die Zusammenstellung der Daten sowie deren wissenschaftliche Auswertung. Die Vorbereitung und Präparation der Spermien, einschließlich Vorbehandlung durch

Elektroporation³⁶ und chemischer Kapazitation³⁷, ebenso wie die Inkubation mit den Kolloiden wurden von Dr. Ulrike Taylor und Dr. Sabine Klein am FLI durchgeführt. Vorbereitungen zur konfokalmikroskopischen Untersuchung erfolgten durch Dr. Sabine Klein. Sowohl die Präparation der Proben für transmissionselektronenmikroskopische (TEM) Aufnahmen als auch deren Durchführung erfolgten durch die Tierärztliche Hochschule Hannover. Ein Teil der TEM-Aufnahmen erfolgten durch Jurij Jakobi (AK Barcikowski, UDE). Dr. Roberto Mancini präparierte die biologischen Proben zur Hybridisierung und stellte diese für die Experimente zur Verfügung.

Analyse der Penetrationseigenschaften von Konjugaten in Rinderspermien

Die Analyse der Penetrationsfähigkeit und der Verbleib von Nanopartikeln in biologischen Zellen wird standardmäßig mit Hilfe von bildgebenden Verfahren wie die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) oder die Konfokalmikroskopie durchgeführt und bewertet. Der Vorteil an dieser Methode ist, dass ein visueller Eindruck über die Lage der Partikel entsteht. Ein Nachteil ist jedoch, dass bei der Konfokalmikroskopie keine Einzelpartikel < 60 nm abgebildet werden können [38] und bei kleinen Zellen wie Spermien aufgrund limitierter Tiefenschärfe nicht erkannt werden kann, an welcher Stelle sich die Partikel befinden. Bei der Konfokalmikroskopie werden Teile des Präparats mit einer Schichtdicke von etwa 1,039 µm abgebildet, indem der abzubildende Bereich abgerastert wird und das Gesamtbild schließlich aus vielen kleinen Punktbereichen, welche nah um den Fokuspunkt liegen, zusammengesetzt wird. Dadurch wird die Auflösung der Aufnahmen erhöht. [225] Bei der TEM-Analyse besteht ein großer Aufwand in der Präparation der Proben, welcher sowohl zeit- als auch kostenaufwändig ist. Allerdings kann hierbei genauer detektiert werden, in welchen Teilen der Zellen sich die Nanopartikel befinden. [111, 151] Hierbei beruht das Messprinzip auf der Streuung und Beugung der Elektronen nach dem Auftreffen auf das zu untersuchende Material. [225]

³⁶ Die Elektroporation ist eine Methode aus der Biologie, mit der die Zellmembran kurzzeitig permeabel gemacht wird, um das Eindringen von beispielsweise DNA (Transfektion) in die Zelle zu ermöglichen. Dieses Verfahren erfolgt vor Zugabe der einzubringenden Spezies. [274]

³⁷ Die Kapazitation ist ein Prozess, der bei Spermien unmittelbar vor der Befruchtung der Eizelle stattfindet und Veränderungen unter anderem der intrazellulären Ionenkonzentrationen und der Fluidität der Plasmamembran zur Folge hat. Dieses Verfahren erfolgt in Anwesenheit der einzubringenden Spezies. [275]

Aufgrund der genannten Nachteile der mikroskopischen Analyse ist es sinnvoll, eine Vorhersage über die Anlagerungs- und Penetrationsfähigkeit von potentiell wirksamen Konjugaten treffen zu können. Zu diesem Zweck wurden Konjugate mit verschiedenen Zusammensetzungen der Oberflächenbedeckung in TRIS-Puffer mit und ohne Spermien inkubiert (37°C, 2 h). Anschließend wurde einerseits die Menge der in TRIS-Puffer ausgefallenen Partikel bestimmt. Andererseits wurde über UV-Vis-spektrometrische Messungen des Überstands der zentrifugierten Spermien bestimmt, welche Menge der Partikel sich im Spermien-Pellet befindet. Dies entspricht der Menge an Nanopartikeln, die vermutlich mit den Spermien in Wechselwirkung steht. Für dieses Experiment wurden biologisch relevante Liganden ausgewählt, welche bereits in der Literatur bekannt sind und sich in biomedizinischen Experimenten aufgrund ihrer beispielsweise guten Biokompatibilität und Interaktion mit Zellen bewährt haben. Demnach wurde SDS, PEG, PVP, CTAB, DB-Tat und NLS_{Cys} ausgewählt. Diese Liganden wurden zum einen als monofunktionale Oberflächenbedeckung³⁸ und zum anderen in Kombination mit verschiedenen DNA-Oligonukleotiden als bi- und trifunktionale Oberflächenbedeckung eingesetzt. Die Ergebnisse aus diesem Experiment sind in Abbildung 60 dargestellt.

Das Ziel dieses Experiments war es, eine Korrelation zwischen der Stabilität der Konjugate in TRIS-Puffer und der Anlagerung an den Spermien zu ermitteln. Es fällt auf, dass die Goldmasse an den Spermien in den meisten Proben nur wenig von der ausgefallenen Goldmasse durch die Zugabe in TRIS-Puffer abweicht. Bei 10 von 14 Varianten (71,4%) ist die Menge der in TRIS ausgefallenen Nanopartikel höher als die Menge der Partikel, die sich im Spermien-Pellet befindet. In ebenso vielen Proben ist die Standardabweichung so groß, dass die Werte als äquivalent angesehen werden können. Hierbei ist anzumerken, dass diese Werte den Stabilitätsuntersuchungen in verschiedenen Puffern (Kapitel 4.3.2.1) entsprechen.

Neben der Variation der Liganden wurde zusätzlich ein DNA-Ligand (5'DNA_{CT28T10}) oder ein DNA-Ligand und ein T20-Spacer (5'DNA_{T20T20}) zur Stabilisierung eingesetzt. Der Einsatz der DNA hat den Hintergrund, dass die Anheftung der Nanopartikel verbessert wird, wenn sich ein Oligonukleotid an dem Partikel befindet. [151] Auffällig ist jedoch, dass bei den Konjugaten mit Oligonukleotiden (91%) maximal 60% der

³⁸ Die Menge der eingesetzten Liganden entspricht relevanten Konzentrationen, welche für die Konjugation von Goldnanopartikeln mit den Liganden SDS, PEG, PVP, CTAB, DB-Tat und NLS_{Cys} eingesetzt wurden. Die Werte dazu sind im Anhang in Tabelle 16 (Kapitel 7.2.2.2) aufgeführt.

Goldmasse an den Spermien zu finden ist, während dies bei den Konjugaten ohne Oligonukleotide nur bei einem Drittel davon (33%) auftritt. Daraus ergibt sich, dass im Allgemeinen die Konjugate eher in dem Spermien-Pellet zu finden sind, wenn eine monofunktionale Bedeckung ohne zusätzliche DNA-Oligonukleotide vorliegt. Polyvinylpyrrolidon (PVP) ist jedoch eine Ausnahme, da hierbei etwa die doppelte Menge der Goldmasse an den Spermien zu finden ist, wenn sich zusätzlich DNA-Oligonukleotide auf der Partikeloberfläche befinden.

Weiterhin besteht die Erwartung, dass mit Oligonukleotiden die Konjugate in TRIS-Puffer stabiler sind als ohne. [111] Dies wird dadurch bestätigt, da bei 82% der Proben weniger als 60% der Nanopartikel ausfallen. Ohne Oligonukleotid fallen 93% der Partikel in TRIS-Puffer aus.

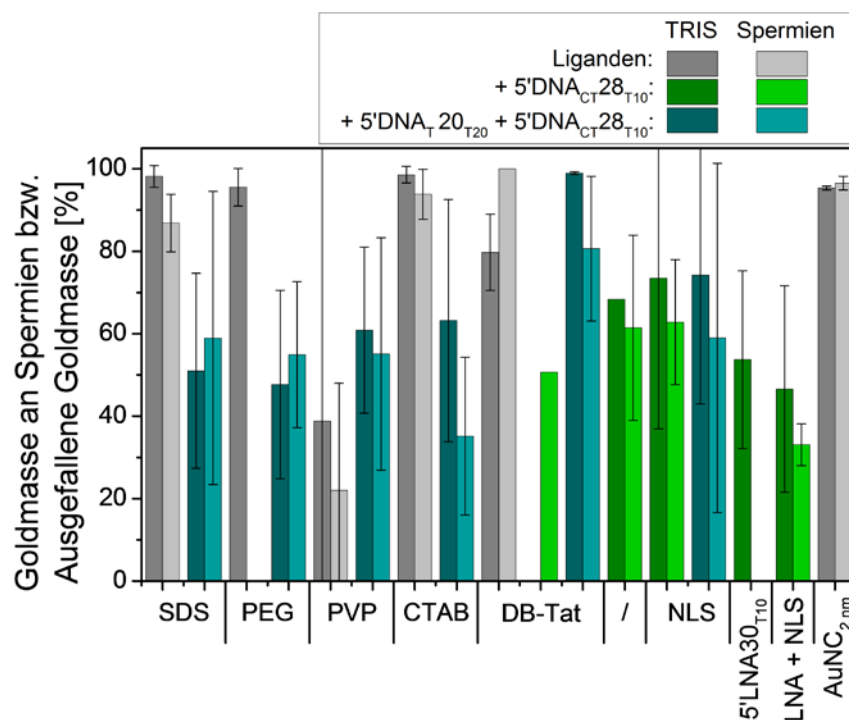


Abbildung 60: Bestimmung der Anlagerung von Konjugaten an die Spermien in Abhängigkeit verschiedener Oberflächenfunktionalisierungen. Vergleich der ausgefallenen Goldmasse nach Zugabe der Konjugate in TRIS-Puffer mit der Goldmasse, welche sich nach Inkubation mit den Spermien in dem abgetrennten Pellet befinden.

Für einen besseren Überblick wurde die in TRIS-Puffer ausgefallene Masse der Goldnanopartikel gegen die Masse der Partikel, welche sich in dem Spermien-Pellet befindet, aufgetragen. (Abbildung 61 A) Hierbei wurden Art und Eigenschaften der Oberflächenliganden außer Acht gelassen.

Es gibt verschiedene Bereiche, in denen sich die ausgefallene Goldmasse mit der Goldmasse an den Spermien überschneidet. Wenn die Konjugate in TRIS-Puffer nicht stabil sind, wie es beispielsweise bei einem Ausfallen der Partikel von 70% ist, so sind

diese Partikel ebenfalls in dem Spermien-Pellet zu finden (Bereich III), da die gebildeten Agglomerate und Aggregate größer und schwerer sind als die Primärpartikel und bereits ohne Zentrifugalkräfte absinken. Hierbei kann zwar nicht ausgeschlossen werden, dass auch die Agglomerate oder Aggregate, welche durch das Überführen in den TRIS-Puffer vor der Inkubation mit den Spermien gebildet werden, mit den Spermien wechselwirken und dadurch möglicherweise stabilisiert werden. Jedoch scheint dieser Aspekt unwahrscheinlich hinsichtlich der Auswertung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen von 5 nm Goldnanopartikeln mit CTAB, SDS, PEG, DB-Tat und chemisch synthetisierten Goldclustern (Abbildung 61 B).

Die Grenzfälle, bei denen entweder viel ($> 70\%$) ausgefallen ist (Bereich I) oder sehr wenig ($< 20\%$; Bereich II) und somit zu einer entsprechend hohen oder niedrigen Menge der Partikel an den Spermien führen müssten, liefern keine verlässlichen Ergebnisse. Die Proben dieser Grenzfälle enthalten beispielsweise jeweils CTAB (Anhang: Abbildung 191 A). Bei der Mittelung der Messwerte entfallen diese Werte außerdem aus den Grenzbereichen. Der mittlere Bereich, in dem 30 - 100% der Goldmasse ausgefallen ist und 15 - 55% der Partikel in dem Spermien-Pellet gefunden wurde (Bereich IV), ist ebenfalls kaum aussagekräftig. In diesem Bereich liegen die Messwerte von den Proben mit PEG, PVP und CTAB, welche als Agglomerate aufgefunden wurden. Allerdings sind auch hierbei Proben mit LNA und NLS_{Cys} zu finden, welche eine reproduzierbare Anlagerung an die Membran der Spermien aufzeigen. (Abbildung 62 A und C)

Anhand dieser Datenerhebung mit verschiedenen Varianten der Liganden kann geschlussfolgert werden, dass die Konjugate in dem vorliegenden Medium zwar eine gewisse Stabilität aufweisen sollten, dies aber nicht gleichzeitig bedeutet, dass die Partikel dann mit der Zellmembran wechselwirken. Es ist nicht möglich, eine verlässliche Vorhersage und erfolgsgerichtete Vorauswahl von Goldnanopartikel-Konjugaten für den Einsatz zur Spermienpenetration lediglich aufgrund ihrer Stabilität in TRIS-Puffer zu treffen. Die Wechselwirkung der Nanopartikel-Konjugate beruht nicht nur auf der Konjugatstabilität, sondern auf ein Zusammenwirken dieser mit weiteren Kriterien wie der Ladung und Funktion der Oberflächenliganden. Aus diesem Grund können auch Agglomerate an der Spermienmembran gefunden werden, wie es bei AuNP+DB-Tat (Abbildung 61 B) zu sehen ist. Dies ist vergleichbar mit Konjugaten, welche mit dem NLS_{Cys}-Peptid gebildet wurden. (Anhang: Abbildung 187) Hierbei erfolgt eine Wechselwirkung der Konjugatliganden mit der Spermienmembran

aufgrund ihrer Ladung und Amphiphilie. [151] Es ist anzumerken, dass die Ladung selbst für eine effektive Anlagerung der Partikel an die Spermienmembran oft nicht ausreichend ist. Ein Beispiel hierfür stellt das Konjugat mit CTAB dar (Abbildung 61 B). Für eine erhöhte Wechselwirkung und wenn keine positiv geladenen Liganden verwendet werden, sollte darauf geachtet werden, dass die Partikeloberfläche nicht vollständig bedeckt ist. In diesem Fall können freie Thiolgruppen auf der Spermienoberfläche mit der Partikeloberfläche reagieren und eine Anlagerung begünstigen. [111]

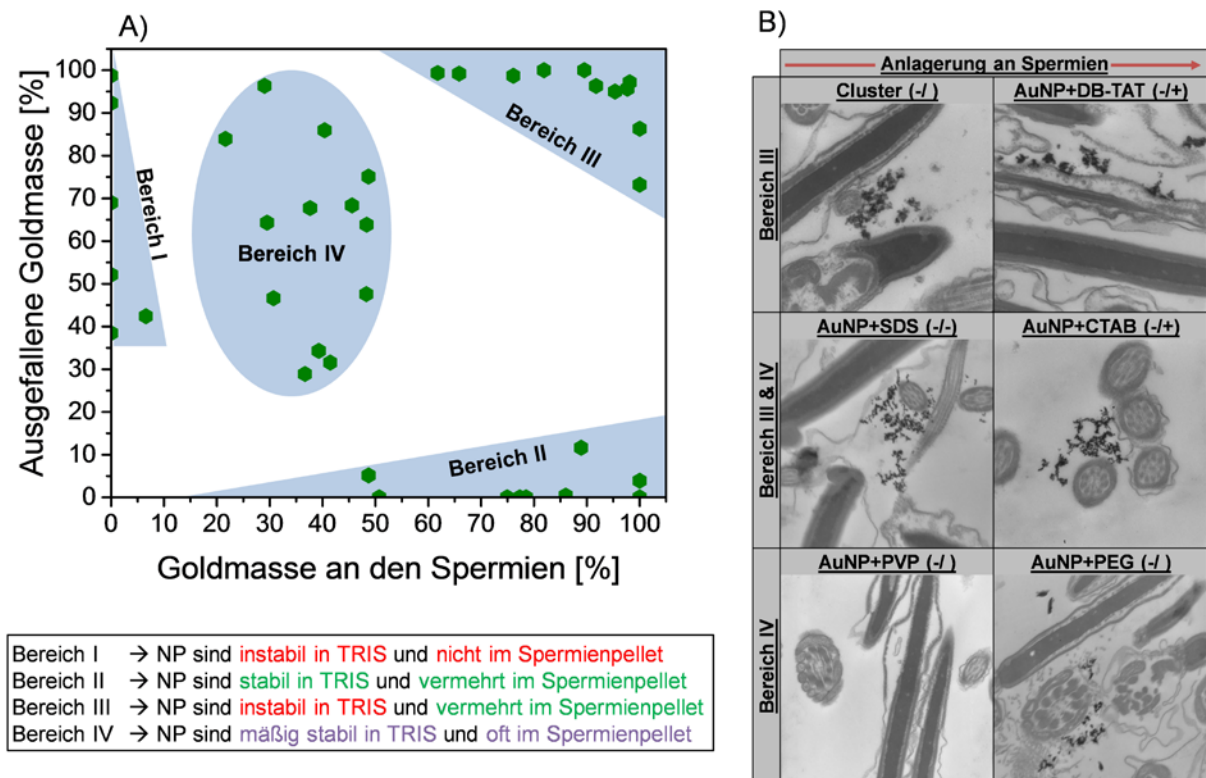


Abbildung 61: Korrelation der ausgefallenen Goldmasse (TRIS-Puffer) mit der Goldmasse, welche sich nach Inkubation mit den Spermien in dem abgetrennten Pellet befinden, unabhängig von der eingesetzten Oberflächenfunktionalisierung. (A) Transmissionselektronische Aufnahmen von Rinderspermien zur Ermittlung der Partikel-Membran-Wechselwirkungen. Die Spermien wurden zuvor 2 Stunden bei 37°C mit verschiedenen Konjugaten inkubiert. (B)

Für die Penetration von Rinderspermien werden Einzelpartikel aufgrund ihrer geringeren Größe gegenüber Agglomeraten bevorzugt. Des Weiteren begünstigen positiv geladene und amphiphile, zellpenetrierende Peptide die Wechselwirkung mit den Spermien. Eine Stabilisierung der Partikel gegenüber Agglomeration aufgrund von Ladungsausgleich mit den Peptiden kann durch die vorherige Anbindung von negativ geladenen Liganden wie Oligonukleotiden [209] oder ungeladenen Liganden wie PVP oder PEG erfolgen.

Das grundsätzliche Auftreten der Wechselwirkung von Goldnanopartikel-Konjugaten mit Rinderspermien, wobei die Oberflächenbelegung aus Oligonukleotiden und Peptiden besteht, wurde bereits gezeigt. [151] Hierbei lagern sich die Partikel als Primärpartikel in einem geordneten Zustand an die Membran an. Diese Anordnung (Abbildung 62 A und C) weist eine derartige Ordnung auf, dass sowohl der Interpartikelabstand als auch der Feret-Durchmesser der angelagerten Partikel ausgewertet wurde. (Abbildung 62 B und D)

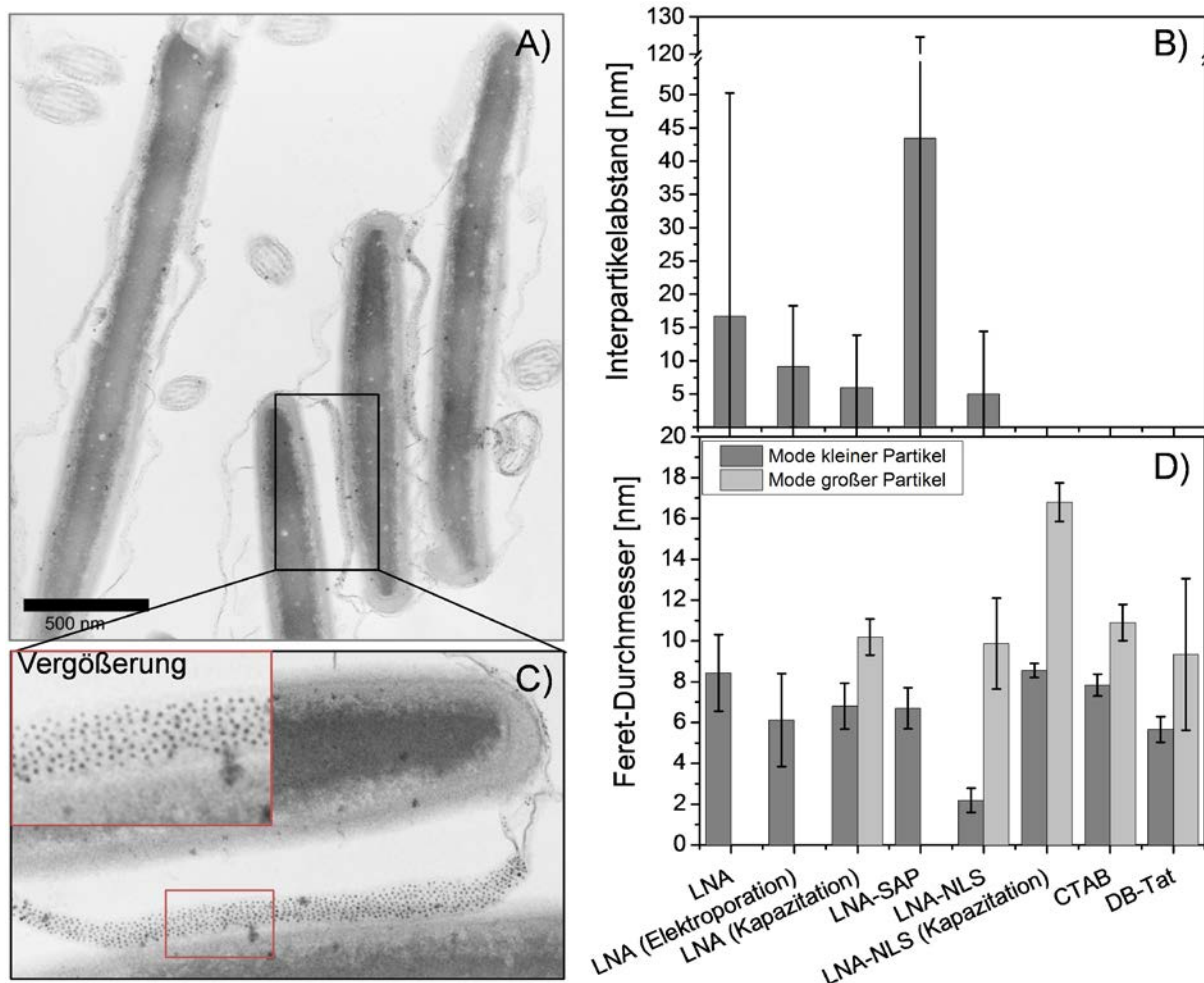


Abbildung 62: Darstellung einer repräsentativen TEM-Aufnahme von Spermien inkubiert mit AuNP-5'LNA30T10-Konjugaten. (A) Die Vergrößerung (C) zeigt die Anordnung der Partikel zwischen zwei Spermien. Darstellung des Interpartikelabstands (B) und des Feret-Durchmessers (D) von verschiedenen Goldnanopartikel-Konjugaten, welche sich nach der Inkubation an der Spermienmembran befinden. Die Sequenz der verwendeten LNA ist 5'LNA30T10.

Die Messung des Feret-Durchmessers ergab zwei Größenordnungen. Zum einen wurden die Partikel in ihrer ursprünglichen Primärpartikelgröße von etwa 5 nm gefunden. Es gibt Abweichungen bis zu einer Größe von 8 nm, wie sie bei der Probe mit LNA und LNA-NLS_{Cys} nach der Behandlung durch Kapazitation zu finden sind. Da es sich bei diesen Aufnahmen ursprünglich nicht um TEM-Aufnahmen zur Ermittlung der Partikelgröße handelt, sondern die Anlagerung der Partikel an die Spermien

untersucht werden sollte, wurde der Aufnahmebereich größer ($27 \times 27 \mu\text{m}^2$) gewählt. Dadurch ist die Auflösung gering und das Vermessen der Partikel ist stärker fehlerbehaftet. Zum anderen liegt die zweite Größenordnung in einem Bereich zwischen $9,3 \pm 3,7 \text{ nm}$ und $16,8 \pm 1,0 \text{ nm}$ und tritt hauptsächlich bei LNA-, CTAB- und DB-Tat-Konjugaten auf. Dies lässt auf das Zusammenlagern von mindestens zwei bis drei Primärpartikeln schließen. CTAB und DB-Tat sind positiv geladen, weshalb die Partikel bei einer Konjugation zur Agglomeration neigen. [72, 82, 151] Im Fall der LNA beruht dieser Effekt auf der geringen Oberflächenbeladung von etwa 10 Liganden pro Partikel. Aufgrund der Tatsache, dass dies in Bezug auf das gesamte Kolloid ein Durchschnittswert ist, unterliegt auch die Oberflächenbedeckung einer Verteilung. Daher kann es Partikel geben, welche nur 5 oder weniger Liganden tragen, wodurch das Zusammenlagern einzelner Partikel in der Pufferumgebung wahrscheinlich ist.

Abbildung 62 C zeigt deutlich, dass die Partikel stark mit der Membran interagieren und dort „stecken bleiben“. Es scheint, als wären die Partikel bereits durch die obere Schicht der Plasmamembran gedrungen und an dieser Stelle fixiert worden. Die Anordnung der Partikel ändert sich abhängig von der Funktionalisierung der Partikel und der Vorbehandlung der Spermien, welche bei diesen Experimenten durch Elektroporation und Kapazitation erfolgte. Bei Konjugaten mit LNA auf der Partikeloberfläche deckt der Interpartikelabstand mit $16,7 \pm 33,5 \text{ nm}$ einen großen Bereich ab. Die LNA hat eine Länge von etwa 9 nm [158, 212], was unter anderem aufgrund der starren Struktur zu einer rechnerisch maximalen hydrodynamischen Größe der Konjugate von $\sim 23 \text{ nm}$ führt. (Abbildung 63 A) Die verwendete LNA ist jedoch mit einem flexiblen Thymin-Spacer ausgestattet. Dadurch können die Liganden, auch aufgrund der geringen Oberflächenbedeckung, abknicken und somit den Gesamtdurchmesser verringern, wodurch die Partikel sich annähern können. Ein Interkalieren der LNA-Liganden benachbarter Partikel ist ebenfalls denkbar. (Abbildung 63 B)

Aufgrund der großen statistischen Fehler ist zudem anzumerken, dass sich die abgebildete Anordnung der Partikel in den TEM-Aufnahmen nicht nur in eine Dimension erstreckt. Die Partikel liegen wahrscheinlich auch übereinander, was in der 2D-Projektion den Eindruck erweckt, dass die Partikel enger zusammenliegen als es tatsächlich der Fall ist. (Abbildung 63 B) Dies betrifft insbesondere die Proben mit LNA und Vorbehandlung durch Elektroporation und Kapazitation, sowie die Proben mit LNA und NLS_{Cys}.

Wird eine Behandlung der Spermien mittels Elektroporation oder Kapazitation durchgeführt, was die Membrangängigkeit erhöhen soll, so wird der Interpartikelabstand reduziert. Bei diesen Verfahren wird die Membranstruktur der Spermien unter anderem bezüglich ihrer Fluidität verändert, was das Eindringen der Nanopartikel erleichtert und zudem zu vermehrten Bindungsstellen an und in der Membran führen kann. Dadurch nähern sich die Partikel scheinbar aneinander an.

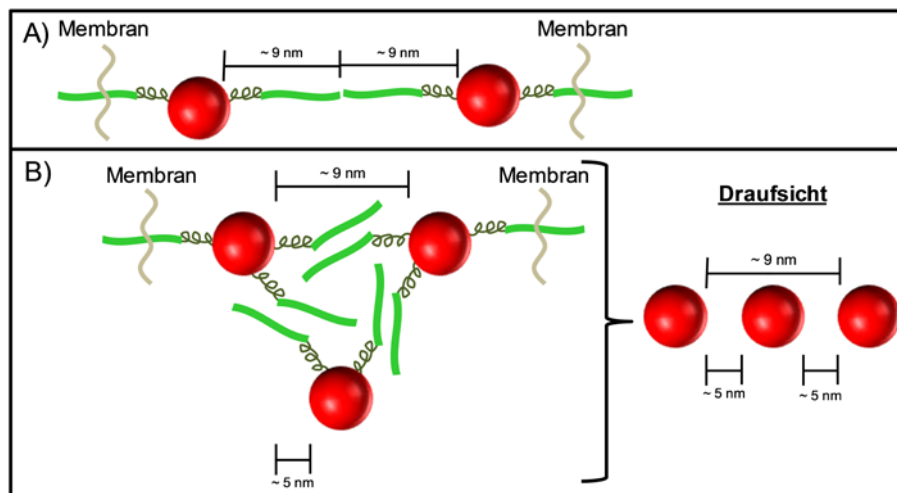


Abbildung 63: Schematische Darstellung der Partikelanordnung an der Spermienmembran.

In Anwesenheit von NLS_{Cys} wird der Interpartikelabstand ebenfalls reduziert, dies erfolgt aufgrund der positiven Ladung und dem damit einhergehenden Ladungsausgleich zwischen den Konjugatpartikeln und schließlich aufgrund der verringerten elektrostatischen Abschirmung. Dies resultiert in einer Agglomeratbildung. [72, 223]

Bei der Verwendung von SAP hingegen ist der Interpartikelabstand mit $43,5 \pm 81,2$ nm extrem groß. Die Partikel liegen hauptsächlich vereinzelt vor, was auf eine geringe Wechselwirkung des Liganden mit der Zellmembran zurückzuführen ist. Dies widerspricht nur teilweise der Erwartung. Bei SAP handelt es sich um ein negativ geladenes CPP, welches die Zellpenetration begünstigen soll. [145] Die negative Ladung des Peptids scheint die Annäherung an die Membran zwar nicht zu begünstigen, allerdings wurde gezeigt, dass dies für die Aufnahme des SAP nicht notwendig ist. Der beschriebene Aufnahmemechanismus des SA-Peptids basiert auf der Endozytose und wurde hauptsächlich mit Krebszelllinien und Fibroblasten untersucht. [145] Da Spermien keine Endozytose durchführen, erklärt dies die schlechte Wechselwirkung der AuNP-SAP-Konjugate mit der Spermienmembran.

Bisher gezeigte Ergebnisse beziehen sich auf eine mögliche Vorhersage für, bezüglich der Spermienpenetration, potentiell wirksame Konjugate und deren Anordnung an der Spermienmembran. Mittels TEM ist es möglich in die Spermien hinein zu schauen und die Nanopartikel örtlich zuzuordnen. Dies stellt jedoch auch ein Problem dar, da aufgrund der TEM-Präparation nur Teilfragmente eines Spermiums gesichtet werden können und die Auswertungsstatistik dadurch schlecht ist. Für einen besseren Überblick bietet sich die auf Lichtmikroskopie basierende Konfokalmikroskopie an. Hierbei kann jedoch nicht so genau wie mittels TEM differenziert werden, an welcher Stelle sich die Partikel befinden. Es ist aber möglich, eine größere Menge an Spermien auszuwerten. Des Weiteren kann der gesamte Spermienkopf im Hinblick auf eine Anlagerung der Partikel untersucht werden und bietet somit die Möglichkeit zur Optimierung der Penetrationsuntersuchung der Partikel. In Verbindung mit Fluoreszenzlebensdauermessungen (FLIM) können des weiteren Abhängigkeiten von der Lage der Partikel auf den Spermien identifiziert werden, ebenso wie eine zeitgleiche Ermittlung der Membranintegrität. Der zu messende Parameter ist bei der Konfokalmikroskopie die Fluoreszenz verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe, also das emittierte Licht nach monochromatischer Anregung der entsprechenden Wellenlänge. [225, 226] Diese Farbstoffe waren an die Liganden der Oberflächenbedeckung gekoppelt. Hierbei wird also untersucht, ob der Farbstoff leuchtet und wie stark die Intensität ist. Bei der Fluoreszenzlebensdauer hingegen wird die Dauer gemessen, die ein Fluoreszenzmolekül im angeregten Zustand befindet bevor es Photonen emittiert. [225, 227]

Es wurden Fluoreszenzlebensdauer-Messungen an Spermien, welche mit funktionalisierten 2 nm Goldnanoclustern (AuNC_{2 nm} der Firma NanopartzTM; Anhang: Kapitel 7.1.3, Tabelle 12; Kapitel 7.2.2.1 und 7.2.2.2) inkubiert wurden, durchgeführt. Die Oberflächenbelegung wurde hierbei variiert und besteht aus 5'LNA22, NLS_{Cys} und einer Kombination beider Liganden. Des Weiteren wurden für diese Messungen die Spermien vor der Präparation mit Propidiumiodid (PI) versetzt, um damit membrandefekte Spermien zu markieren und von membranintakten Spermien zu unterscheiden. Die konfokalmikroskopische Aufnahme (Abbildung 64 A) zeigt, dass die Spermien aufgrund der Anlagerung der Farbstoffe (AlexaFluor488 bei LNA und Fluorescein bei NLS_{Cys}) grün gefärbt sind. Dies lässt auf ein Wechselwirken der Spermien mit den AuNC_{2 nm}-Konjugaten schließen. Die membrandefekten Spermien sind hierbei rot dargestellt. Anhand der Darstellung der Fluoreszenzlebensdauer

(Abbildung 64 B) wird deutlich, dass diese Fluorophore eine vergleichsweise geringe Fluoreszenz-Lebensdauer von etwa 2 ns (blaue Färbung) besitzen. Die Spermien, welche PI-gefärbt, also membrandefekt sind, weisen in der FLIM-Aufnahme eine grün-rote Färbung auf. Diese deutet auf höhere Werte der Lebensdauer von ~4 ns hin.

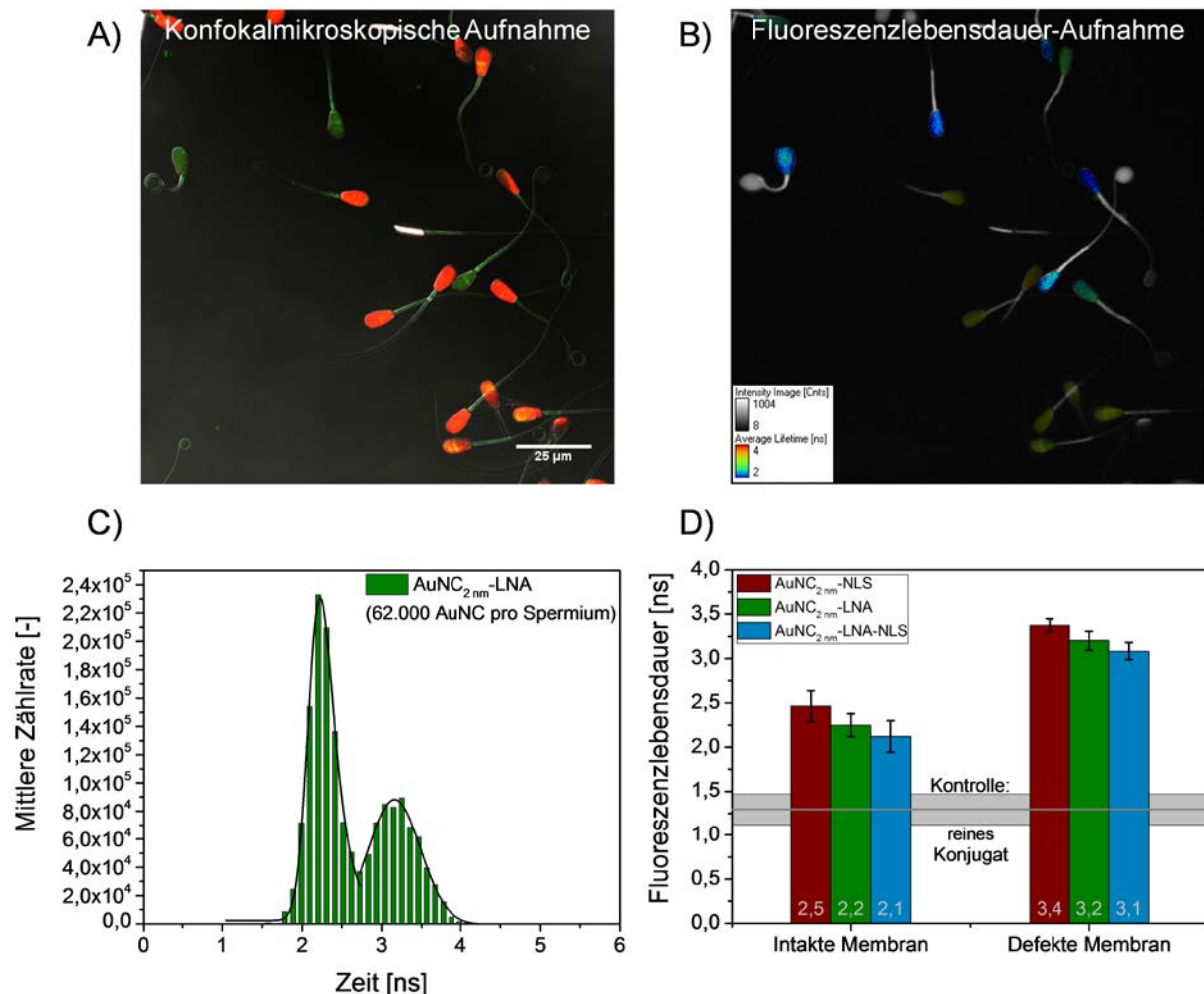


Abbildung 64: Differenzierung von toten und lebenden Spermien anhand der Fluoreszenzlebensdauer der Farbstoffe AlexaFluor488 und Fluorescein, welche an den Liganden der Oberflächenbedeckung der Nanocluster gekoppelt sind. Konfokalmikroskopische Aufnahme (A) und visuelle Darstellung der Fluoreszenzlebensdauer (B) von Spermien, welche mit 0,5 µg/mL AuNC_{2 nm}-LNA 2 Stunden inkubiert wurden. In A) sind die Goldnanocluster in grün dargestellt, eine Tot-Färbung wurde mittels Propidiumiodid (rot) durchgeführt. Eine Lebensdauer von 2 ns ist in B) blau dargestellt, während 4 ns rot dargestellt sind. C) Spektrum der Fluoreszenzlebensdauer von AuNC_{2 nm}-LNA-Konjugaten. D) Darstellung der Fluoreszenzlebensdauer von AuNP-LNA, AuNP-NLS_{Cys} und AuNP-LNA-NLS_{Cys} an oder in lebenden und toten Spermien.

Für die Auswertung der Lebensdauer sollen nur die Spermienköpfe betrachtet werden. Aus diesem Grund werden die Köpfe markiert und ein sogenannter ROI (engl.: *Region of Interest*) erstellt. Zur Bestimmung der Lebensdauer werden alle ROIs einbezogen und es wird ein Histogramm der Intensitätsverteilung erstellt. (Abbildung 64 C) In diesem ist eine bimodale Verteilung der Lebensdauer zu erkennen, welche sich anhand des Farbcodes in der Abbildung wiederfinden lässt. Die ermittelten Werte der Lebensdauer liegen bei 2,2 ns und 3,2 ns. Dieser Unterschied kann auf die Lage der

Partikel auf den Spermien zurückzuführen sein. [228] Wie bereits beschrieben, ist die geringe Lebensdauer der Fluoreszenzfarbstoffe den Partikeln auf membranintakten Spermien (kein PI, nicht rot gefärbt) zuzuordnen. Hierbei lagern sich die Partikel vermutlich lediglich an der Membran an und durchdringen sie nicht, wie es bereits bei den hier verwendeten Funktionsmolekülen gezeigt wurde. [151]

Die Fluorophore sind bei dieser Anlagerung nicht von zellulärer Matrix bedeckt, wodurch die Fluoreszenz nicht oder nur geringfügig durch die Kontaktstelle mit der Membran beeinflusst wird. Ist die Membran nicht mehr intakt, was durch die Detektion von PI bestätigt wird, sind die Spermien akrosomreagiert. Dadurch erhöht sich die Fluidität der Membran und die Partikel können diese durchdringen. [151] Die Partikel liegen dadurch innerhalb der Spermien vor und sind von zellulärer Matrix der Membran bedeckt. Dies bedeutet für die Fluorophore eine Änderung des umgebenden Mediums, was schließlich zu einer Erhöhung der Lebensdauer führt. [227, 228, 229]

Die Fluoreszenzlebensdauer wird durch verschiedene Parameter des umgebenden Mediums beeinflusst. Hierzu zählen der Brechungsindex [227, 229], die Viskosität [227, 228], die Temperatur [227], die Polarität [227, 229] und der pH-Wert [230] des umgebenden Mediums. Bis auf die Parameter der Viskosität und des pH-Wertes ändert sich die Fluoreszenzlebensdauer der Farbstoffe antiproportional zu der Änderung der Umgebungsparameter. [227, 228, 229, 230]

Die Abhängigkeit der Fluoreszenzlebensdauer von dem umgebenden Medium beruht auf einer Vielzahl an möglichen Prozessen. So kann nach Anregung eines Fluorophors eine Umverteilung der Elektronen, chemische Reaktionen oder eine geometrische Änderung in Form der Neuordnung der umgebenden Moleküle stattfinden. In den meisten Fällen erfolgt jedoch ein nicht-strahlender Prozess, welcher auch *Quenching* genannt wird und zu einer Reduktion der Lebensdauer führt. Dieser Prozess kann sowohl intern als auch extern ablaufen. Bei internem Quenching wird die eingebrachte Energie in die Vibration und Rotation der Moleküle übertragen. Bei externem Quenching hingegen wird die Energie aus dem Molekül gebracht und auf andere Moleküle übertragen, wie es bei FRET-Prozessen (engl.: Förster Resonance Energy Transfer) der Fall ist. [227]

Ein Einfluss der Lebensdauer durch gemessene Photonen des Propidiumiodids kann ausgeschlossen werden, da der Detektionsbereich der Fluoreszenz des AlexaFluor488 (Alexa488) und des Fluoresceins mit 505-550 nm so gewählt wurde, dass er außerhalb der Emission von Propidiumiodid liegt.

Wie Abbildung 64 D entnommen werden kann, gibt es sowohl bei membranintakten als auch bei akrosomreagierten Spermien eine Abhängigkeit der Lebensdauer von den gebundenen Liganden. Die Belegung der Partikel mit einer LNA führt zu einer geringeren Fluoreszenzlebensdauer als die Belegung mit einem NLS_{Cys}-Peptid. Besteht die Oberflächenbedeckung aus einer Kombination der beiden Moleküle, sinkt die Lebensdauer. Hierbei ist anzumerken, dass bei dem AuNC_{2 nm}-LNA AlexaFluor488 als Fluorophor verwendet wurde und für die Peptid-Konjugate wurde Fluorescein verwendet. Bei der Bewertung der Messungen der Fluoreszenzlebensdauer kann dies jedoch vernachlässigt werden, da die beiden Fluorophore in ihren Fluoreszenzeigenschaften vergleichbar sind und eine ursprüngliche Lebensdauer von 4,1 ns haben. [231, 232, 233] Die Fluoreszenzlebensdauer der Fluorophore, wenn sie über die Liganden an den Goldnanoclustern gebunden sind, hingegen beträgt nur $1,3 \pm 0,2$ ns. (Abbildung 64 D) Die geringere Lebensdauer im Vergleich zu den reinen Fluorophoren kann hier auf die lokale Konzentration der Fluorophore an den Clustern zurückgeführt werden. Hierbei wird aufgrund der Plasmonenresonanz der Partikel das lokale Feld an der Partikeloberfläche erhöht, was zu einer verstärkten Anregung der naheliegenden Fluorophore führt. Zudem erfolgt ein Anstieg der Strahlungsabklingrate der Fluoreszenzmoleküle. Dies kann eine höhere Quantenausbeute, eine verringerte Lebensdauer und verbesserte Photostabilität zur Folge haben. [234, 235]

Das Auftreten von unterschiedlichen Lebensdauern für die verschiedenen Liganden kann auf die lokal unterschiedlich ausgeprägte Anlagerung der Konjugate an den verschiedenen Spermienkompartimenten zurückzuführen sein. So ist wie bereits erwähnt aus der Literatur bekannt, dass die Fluoreszenzlebensdauer in dichter Umgebung erhöht wird. [228] Dies gilt beispielsweise für die Bereiche der Zellmembran und die Anwesenheit von DNA, wie den Zellkern. Bereiche mit geringerer Dichte sind dementsprechend das Cytosol oder biologische Flüssigkeiten. [227]

Das unterschiedliche Verhalten der beiden Liganden bei der Wechselwirkung mit Rinderspermien wird durch konfokalmikroskopische Messungen bestätigt. Hierbei wurde eine Anlagerung der LNA-Liganden bevorzugt an der dichteren

Plasmamembran gefunden. Die NLS_{Cys}-Liganden kamen vermehrt im postakrosomalen Bereich, vermutlich auch innerhalb des Spermiums, vor. (Anhang: Abbildung 195) Aus den vorliegenden Ergebnissen kann zudem geschlossen werden, dass die monofunktionalen Konjugate tiefer in die Membran eindringen als das bifunktionale Konjugat mit LNA und NLS_{Cys}. Allerdings scheint die Verwendung des NLS_{Cys}-Peptids das Eindringen zu begünstigen, dies ist auf die Funktion der Zellpenetration zurückzuführen. [236]

Im Folgenden soll näher auf die Anlagerung der funktionalen Goldnanocluster an die verschiedenen Segmente der Spermienmembran eingegangen werden. Für ein besseres Verständnis sind in Abbildung 65 die einzelnen Segmente des Spermienkopfes graphisch dargestellt und erklärt.

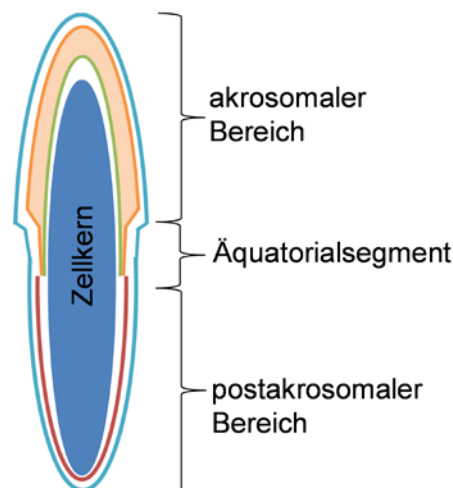


Abbildung 65: Aufbau eines Spermiums und Darstellung der einzelnen Segmente der Spermienmembran. Diese Graphik wurde nach Barchanski et al. [151] eigenhändig erstellt.

Abbildung 66 A zeigt eine konfokalmikroskopische Aufnahme einer Spermiengruppe, welche mit $6,0 \cdot 10^4$ AuNC_{2 nm}-LNA_{Alexa488} pro Spermium inkubiert wurde. Bereits bei dieser Bildgröße von $114 \times 114 \mu\text{m}$ (1024×1024 Pixel) können Unterschiede in der Intensität des eingesetzten Fluoreszenzfarbstoffes, welcher an die eingesetzten Goldnanocluster gebunden ist, gefunden werden. Dies kann durch einen Linescan, also der Auftragung der Fluoreszenz-Intensität vom Kopfende bis zum Geißelansatz in Abhängigkeit der Distanz, verdeutlicht und bestätigt werden. Eine solche Auftragung ist in Abbildung 67 A für verschiedene Partikeldosen von 25.000-400.000 Cluster pro Spermium (= 0,2 - 3,3 $\mu\text{g/mL}$ pro 10^8 Spermien) zu sehen. Anhand des Intensitätsverlaufs in Abhängigkeit der Distanz, welche den Weg quer über den Spermien-Kopf beschreibt, ist eine verstärkte Ansammlung der Partikel im Bereich des

Äquatorialsegment und des Geißelansatzes zu erkennen. Dies kann deutlicher an der Vergrößerung einer dreidimensionalen Aufnahme eines Spermiums (Abbildung 67 C) gesehen werden. Anhand dieser Messungen kann die, bereits in der Literatur beschriebene, vermehrte Anlagerung von LNA-funktionalisierten Partikeln zwischen der Kernhülle und der postakrosomalen Hülle (untere Spermienkopfhälfte) bestätigt werden. [151]

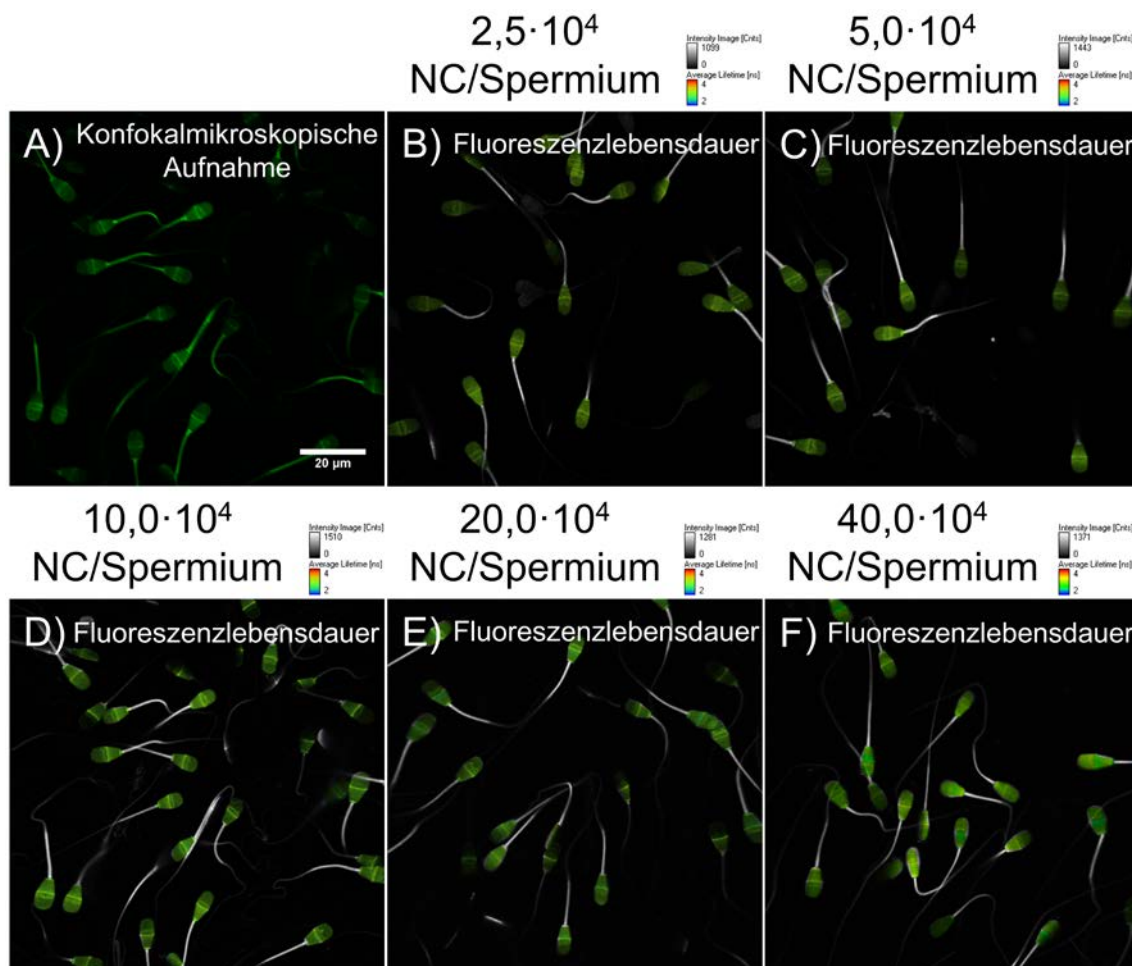


Abbildung 66: Konfokalmikroskopische Aufnahme (A) und Aufnahmen der Fluoreszenzlebensdauer (B-F) von AuNC₂ nm-LNA-Konjugaten inkubiert mit Rinderspermien bei Konzentrationen von 0,2 µg/mL, 0,4 µg/mL, 0,8 µg/mL, 1,6 µg/mL und 3,3 µg/mL. Eine Lebensdauer von 2 ns wird blau dargestellt und eine Lebensdauer von 4 ns wird rot dargestellt. Zwischenwerte werden grün dargestellt.

Die erhöhte Fluoreszenzintensität am Äquatorialsegment des Spermienkopfes kann auf eine vermehrte Anlagerung der Partikel aufgrund einer Diffusionsbarriere zurückgeführt werden. Zwischen dem Postakrosom und dem Äquatorialsegment verläuft eine Barriere, welche eine Diffusion von Komplexen, die aus mindestens einem Dutzend Molekülen bestehen, in den oberen Teil des Spermienkopfes verhindert. [237] Demnach können auch die größeren Nanocluster-Konjugate diese Barriere nicht durchdringen. Dies geht weiterhin einher mit der geringeren Diffusion

von Lipiden, welche im Postakrosom vorliegt. [238] Die vermehrte Anlagerung der Partikel an dem Geißelansatz der Spermien kann auf die dort befindlichen Mitochondrien zurückgeführt werden. [239]

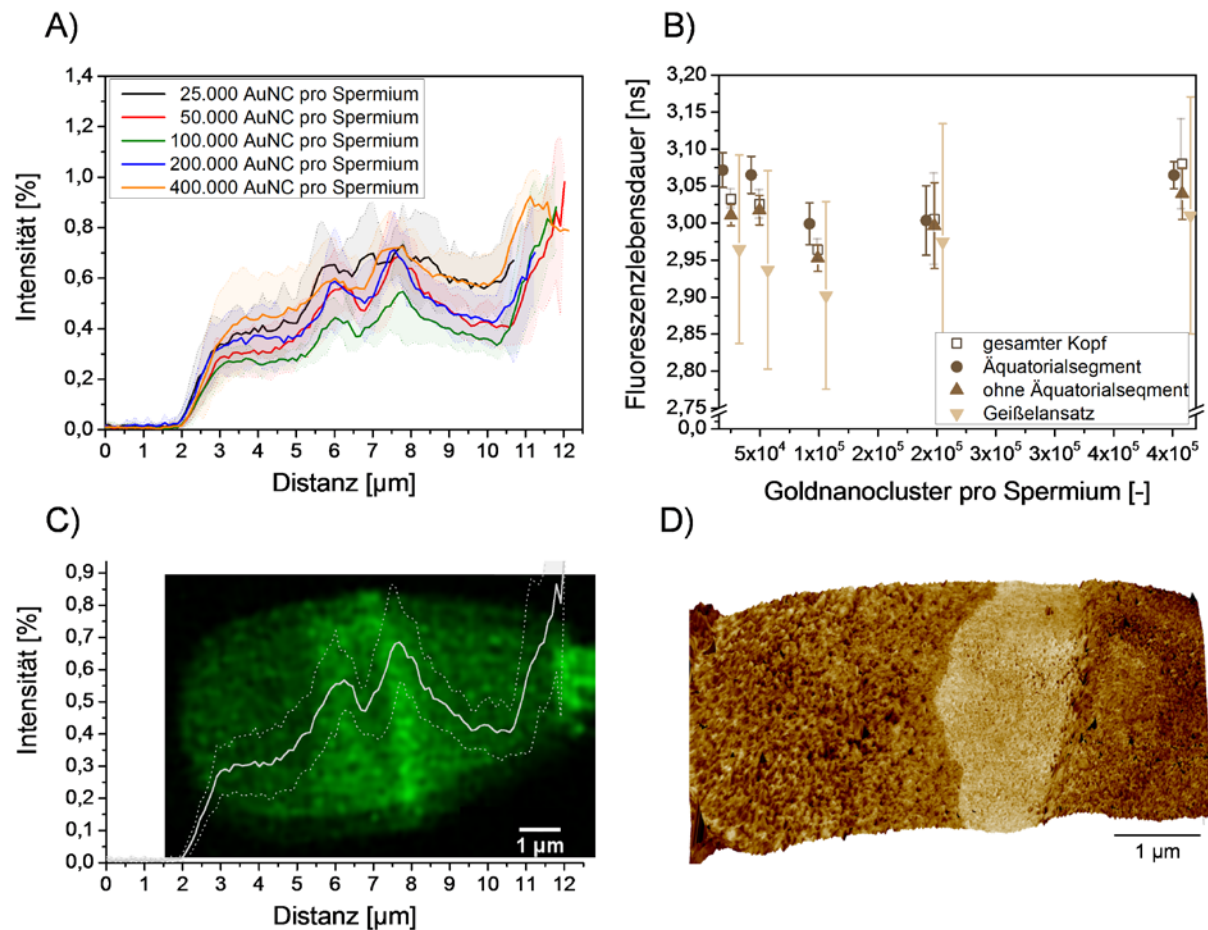


Abbildung 67: Anlagerung von AuNC₂ nm-LNA-Konjugaten an Rinderspermien. A) Linearescan quer über die Spermien zur Ermittlung der Anlagerungshäufigkeit auf den Spermien. B) Darstellung der Fluoreszenzlebensdauer der verschiedenen Kompartimente auf dem Spermienkopf in Abhängigkeit der Anzahl an Clustern pro Spermium. C) 3D-Darstellung eines Spermiums aufgenommen mittels Konfokalmikroskopie. D) AFM-Aufnahme eines Spermiums zur Ermittlung der Oberflächenfestigkeit der Spermienmembran.

Die bereits in der konfokalmikroskopischen Aufnahme entdeckte spezifische Anlagerung der Partikel-Konjugate an die Spermienmembran, welche bevorzugt am Äquatorialesegment vorliegt, tritt ebenfalls bei der Fluoreszenzlebensdauer der Fluorophore auf. In den Aufnahmen mit verschiedenen Partikeldosen (Abbildung 66 B-F) ist zu erkennen, dass das Äquatorialesegment heller eingefärbt ist als der postakrosomale Bereich unterhalb des Äquatorialesegments bis zum Geißelansatz und der Bereich des Akrosoms. Entsprechend der Farbskala deutet dies auf eine höhere Fluoreszenzlebensdauer hin. In den dargestellten Bildern ist zu erkennen, dass nur der Spermienkopf eingefärbt ist. Das liegt daran, dass bei der Auswertung der Kopf markiert wurde, um den ROI auszuwählen. Bei der Ermittlung der Fluoreszenzlebensdauer für die verschiedenen Segmente des Spermienkopfes wird

nur dieser Bereich berücksichtigt, sodass eine Differenzierung abhängig von den verschiedenen Kompartimenten des Spermienkopfes möglich ist. Die Daten aus dieser Auswertung sind in Abbildung 67 B in Abhängigkeit der eingesetzten Menge an AuNC_{2 nm}-LNA pro Spermium dargestellt.

Die Fluoreszenzlebensdauer des Fluorophors AlexaFluor488, welches mit der 5'LNA22 an den 2 nm Goldnanoclustern gebunden ist, beträgt $1,3 \pm 0,2$ ns. (Abbildung 64 D) Alle gemessenen Werte der Fluoreszenzlebensdauer liegen oberhalb des Referenzwerts zwischen $2,9 \pm 0,1$ ns bis $3,1 \pm 0,1$ ns, dies liegt an der Änderung der Umgebungsparameter wie dem Brechungsindex. [227, 228, 229] Ein weiteres Anzeichen, dass die Partikel mit der Oberfläche der Spermienmembran wechselwirken, ist die dichtere Struktur der Membran im Vergleich zum TRIS-Puffer als Lösung. Diese hat größere Werte der Fluoreszenzlebensdauer zur Folge. [228]

Bei der Betrachtung der Fluoreszenzlebensdauer der verschiedenen Segmente auf der Spermienoberfläche (Abbildung 67 B) ist erkennbar, dass eine Abhängigkeit von den Bereichen besteht. Die Fluoreszenzlebensdauer der Fluorophore am Äquatoralsegment weist bei allen Partikeldosen die höchste Lebensdauer auf.

Befinden sich die Partikel am Akrosom oder postakrosomalen Bereich, so wird eine mittlere Lebensdauer von 3,0 ns ermittelt. Partikel am Geißelansatz haben mit 2,9 – 3,0 ns die geringste Lebensdauer, die in diesem Zusammenhang gemessen wurde. Die Werte in diesem Bereich weisen außerdem eine hohe Standardabweichung von bis zu 5,4% der Lebensdauer auf, während die anderen gemessenen Werte im Vergleich eine Abweichung von maximal 2,1% aufweisen. Des Weiteren wurden die Unterschiede der Lebensdauer-Werte zwischen den verschiedenen Bereichen ermittelt. Die Differenz zwischen dem Äquatoralsegment und dem akrosomalen/postakrosomalen Bereich (0,2 – 2,0 ns) ist kleiner als die Differenz zwischen dem Geißelansatz und dem akrosomalen/postakrosomalen Bereich (0,7 – 2,7 ns). (Anhang: Abbildung 196) Die Unterschiede für die jeweilige Partikeldosis liegen in einem Bereich von 4-15 ps und sind damit so gering, dass sie innerhalb des messbaren Fehlers liegen. Allerdings sind die Unterschiede in der Lebensdauer und die Abhängigkeit von dem Segment, in dem sie gemessen wurden, reproduzierbar. Daher kann hierbei die Standardabweichung vernachlässigt werden.

Neben der Abhängigkeit der Fluoreszenzlebensdauer von dem Bereich, an dem die Partikel sich befinden, ist eine Abhängigkeit von der eingesetzten Partikelmenge pro

Spermium zu verzeichnen. Die Lebensdauer sämtlicher Bereiche nimmt mit steigender Anzahl an Partikel/Spermium ab und erreicht bei 99.000 Goldnanocluster/Spermium (0,8 µg/mL auf 10^8 Spermien) ein Minimum der Fluoreszenzlebensdauer. Dieser Effekt kann auf Fluoreszenzquenching zurückzuführen sein. Bei einer größeren Menge der eingesetzten Partikel steigt die Menge der Partikel, die sich auf den Spermien anlagern. Hierdurch verringert sich der Platz zwischen den Partikeln und es tritt ein Quenching der Fluoreszenz ein. Die Lebensdauer der Fluoreszenz wird somit verringert. [227] Dies kann außerdem die niedrigere Lebensdauer der AlexaFluor488-Fluorophore begründen, welche an den Partikeln gebunden sind, die an dem Geißelansatz akkumulieren. Für höhere Partikeldosen steigen die Werte der Lebensdauer wieder an.

Anhand der Fluoreszenzintensität der AuNP-LNA_{Alexa488} kann vermutet werden, dass im akrosomalen und postakrosomalen Bereich des Spermienkopfes, wo die Fluoreszenzintensität geringer ist, eine geringere Anlagerung der Partikel vorliegt. Hierbei müsste die Lebensdauer höher sein als am Äquatoralsegment und am Geißelansatz. [227] Aus den Daten wird jedoch ersichtlich, dass in dieser Region die Lebensdauer des Fluorophors kleiner ist als am Äquatoralsegment und größer als am Geißelansatz. Der Grund kann hier in der Festigkeit der Membran liegen. Anhand von AFM-Messungen (Abbildung 67 D) kann eine Aussage über die Steifigkeit der Spermienmembran getätigt werden. Das Äquatoralsegment weist im Vergleich zu dem Akrosom und dem Postakrosom eine höhere Steifigkeit auf. Dies hängt mit der bereits beschriebenen reduzierten Diffusion [238] von Molekülaggregaten und der Diffusionsbarriere [237] zusammen, die das Äquatoralsegment bildet. Außerdem kann aufgrund der Steifigkeit eine dichtere Struktur erwartet werden, welche eine höhere Lebensdauer zur Folge hat. [228]

Die Schlussfolgerung aus diesem Kapitel ist, dass zum einen keine Möglichkeit besteht, eine verlässliche und reproduzierbare Vorhersage über die Fähigkeit von Nanopartikel- und Nanocluster-Konjugaten zur Penetration in Rinderspermien zu treffen. Zum anderen wurde eine signifikante und in gewisser Weise geordnete Anlagerung von LNA-Konjugaten gefunden, durch die ein erster Einblick in die Wechselwirkungen der Partikel mit der Spermienmembran gewonnen werden konnte. Zu der standardmäßigen Methode der Transmissionselektronenmikroskopie stellt sich

die Konfokalmikroskopie in Verbindung mit Fluoreszenzlebensdauer-Messungen als geeignete Alternative zur Aufklärung der auftretenden Wechselwirkungen dar. Es ist möglich mittels FLIM Unterschiede in der Membranintegrität zu ermitteln. Auch die bevorzugte Anlagerung der Partikel an bestimmte Segmente der Membran, wie das Äquatoralsegment, resultiert in einer veränderten Lebensdauer. Diese Erkenntnisse in Kombination mit Informationen über die Festigkeit der Membran aus AFM-Messungen, liefern neue Hinweise bezüglich der Nanopartikel-Membran-Wechselwirkung zur Optimierung der Nanopartikel-Penetration in membranintakte Rinderspermien.

Analyse der Hybridisierungseigenschaften von Goldnanopartikel-Konjugaten

Neben der Penetration der Spermien stellen die Hybridisierungseigenschaften der Konjugate einen wesentlichen Punkt in der Markierung von Spermien zur geschlechtsspezifischen Trennung dar. Aufgrund der Tatsache, dass die Penetration an vitalen Spermien noch nicht gesichert ist, wurden die Experimente zur Hybridisierung verschiedener LNA-Sequenzen separat von den Penetrationsversuchen durchgeführt. Hierzu wurden geschlechtssortierte demembranierte Spermienköpfe und genomische DNA (gDNA) (Abbildung 68) verwendet, um möglichst dem finalen Konstrukt des befruchtungsfähigen Spermiums zu entsprechen und somit eine Hybridisierung an biologisch relevanten Proben zu erreichen. Teile dieses Kapitels wurden in einer Publikation verarbeitet und bei dem Journal *Analyst* veröffentlicht.³⁹ [276]

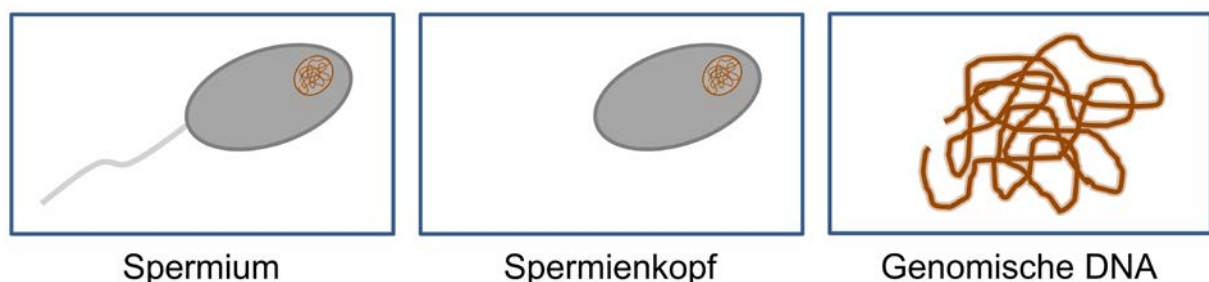


Abbildung 68: Schematische Darstellung von einem Spermium, einem Spermienkopf und genomische DNA zur Verdeutlichung der räumlichen Anordnung der DNA in verschiedenen Zuständen.

³⁹ Gamrad, L.; Mancini, R.; Werner, D.; Tiedemann, D.; Taylor, U.; Ziefus, A.; Rehbock, C.; Klein, S.; Kues, W.; Barcikowski, S.; Rath, D.; Triplex-hybridizing bioconjugated gold nanoparticles for specific Y-chromosome sequence targeting of bull spermatozoa. *Analyst*, **2017**, akzeptiertes Manuskript, <http://dx.doi.org/10.1039/C6AN02461K>.

Bei der Untersuchung der Hybridisierung wurden optische Methoden wie die UV-Vis-Spektroskopie, die direkte Streulichtmessung und die Dynamische Lichtstreuung eingesetzt. Hierbei wurde angenommen, dass die Partikelgröße sich aufgrund der Anbindung an die Spermienköpfe oder die genomische DNA vergrößert. Ein Einfluss auf die Ladung wurde erwartet, weil es sich bei den biologischen Proben um negativ geladene Substanzen handelt.

Zu Beginn der Experimente wurden mittels DLS und Schmelzkurvenanalyse allgemeine Untersuchungen durchgeführt, um herauszufinden, ob die AuNP-LNA-Sonden an den biologischen Proben binden und ob es sich hierbei um zufällige elektrostatische Wechselwirkungen oder eine spezifische Triplex-Hybridisierung handelt. Die Bindung oder Anhaftung der Sonden an die biologischen Proben soll hierbei mittels DLS bestimmt werden. Die Schmelzkurvenanalyse liefert anschließend Daten über eine spezifische Hybridisierung.

In Abbildung 69 A ist der hydrodynamische Durchmesser der eingesetzten AuNP-5'LNA30_{T10}-Sonde anhand des grünen Dreiecks markiert. Die Größe, welche aus der Volumenverteilung ermittelt wurde, beträgt $12,5 \pm 0,7$ nm. In hybridisierter Form beträgt der Durchmesser der Partikel an den Spermienköpfen $14,2 \pm 2,1$ nm (männlich) und $13,8 \pm 1,4$ nm (weiblich) sowie an der genomischen DNA $10,3 \pm 2,8$ nm (männlich) und $14,6 \pm 3,4$ nm (weiblich). Als Hybrid mit den Spermienköpfen steigt sowohl für die männliche als auch für die weibliche Spezies der Durchmesser an, wohingegen bei der genomischen DNA die Größe der Partikel bei der Hybridisierung nur nach der Hybridisierung mit weiblicher DNA steigt. Die Vergrößerung des Durchmessers beträgt 1,3 bis 2,1 nm, woraus zu schließen ist, dass hierbei keine hohe Ansammlung der Partikel vorliegt. Dies ist dennoch ein Anzeichen dafür, dass eine Veränderung der Partikel aufgrund einer Wechselwirkung der Nanopartikelsonden mit der genomischen DNA stattgefunden hat.

Die Ergebnisse des Zetapotentials (Abbildung 69 B) weisen bezüglich der AuNP-5'LNA30_{T10}-Sonde den gleichen Effekt auf. Des Weiteren konnte auch das Zetapotential der Spermienköpfe und der genomischen DNA ohne Partikel-Sonde gemessen werden. Die Werte sind als schwarze Linien im Diagramm gekennzeichnet. Es ist zu erkennen, dass bei allen Proben das Zetapotential der hybridisierten Spezies verringert wird, also betragsmäßig ansteigt, dies deutet auf eine Anbindung der Sonden an die stark negativ geladenen Zielobjekte in Form von DNA hin. Bei dieser

Methode konnte jedoch ebenfalls keine eindeutige Differenzierung zwischen der männlichen und weiblichen Spezies festgestellt werden. Eine Anbindung der Goldnanopartikel-Konjugate an die demembraniserten Spermienköpfe, ohne geschlechtsspezifische Differenzierung, konnte außerdem mittels Konfokalmikroskopie dargestellt werden. (Anhang: Abbildung 205)

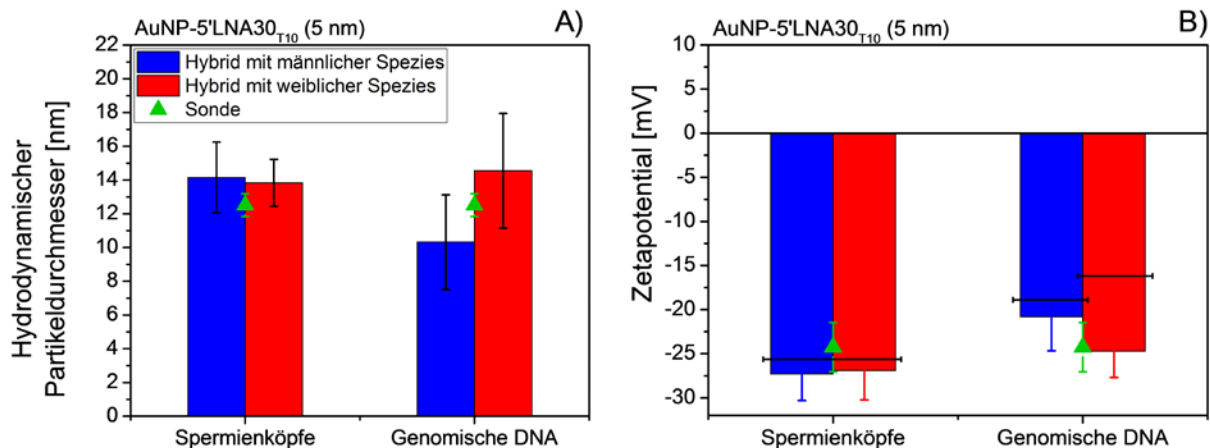


Abbildung 69: Hybridisierung von Goldnanopartikeln, welche mit LNA-Sonden funktionalisiert worden sind. Hydrodynamischer Partikeldurchmesser (Volumenverteilung) (A) und Zetapotential (B) von AuNP-5'LNA30_{T10}-Konjugaten nach der Hybridisierung mit demembraniserten Spermienköpfen und genomischer DNA unter Verwendung von 5 nm großen Goldnanopartikeln.

Nachdem anhand von DLS und Konfokalmikroskopie eine Anbindung der AuNP-5'LNA30_{T10}-Konjugate an demembranierte Spermienköpfe und genomische DNA detektiert wurde, erfolgte eine spezifischere funktionale Untersuchung. Hierbei handelt es sich um die Schmelzkurvenanalyse, welche bereits zuvor (Kapitel 4.3.2.2) bei der Ermittlung der Funktionsfähigkeit der ausgewählten Konjugate an synthetische Doppelstrang-DNA durchgeführt wurde. In diesem Experiment wurde die Analyse nach der Hybridisierung der AuNP-LNA-Sonde an genomische DNA durchgeführt. Abbildung 70 zeigt die ermittelten Schmelzpunkte.

Anhand der zwei auftretenden Schmelzpunkte ist zu erkennen, dass die Triplex-Hybridisierung erfolgreich war. Während der Triplex-Schmelzpunkt sowohl für die männliche als auch für die weibliche gDNA vergleichbar ist und bei $33,2 \pm 6,6^\circ\text{C}$ und $32,3 \pm 4,7^\circ\text{C}$ liegt, besitzt die männliche gDNA einen um $\sim 13^\circ\text{C}$ höheren Schmelzpunkt des Duplex. Demzufolge ist die Triplexhybridisierung unspezifisch gegenüber dem Geschlecht. Die Schmelztemperatur des Triplex der genomischen DNA ist im Vergleich zu der in Kapitel 4.3.2.2 bestimmten Schmelztemperatur von $41,0 \pm 11,3^\circ\text{C}$ (Abbildung 58) der synthetischen DNA um etwa 8°C geringer. Dies deutet darauf hin, dass die Triplex-Hybridisierung mit der biologischen Probe weniger stabil ist. Der Grund hierfür kann auf die Struktur der beiden DNA-Varianten zurückgeführt werden.

Die genomische DNA weist mit ungefähr 3 Milliarden Basenpaaren eine große und voluminöse Struktur auf, welche die Triplex-Bindung erschwert. Die synthetische DNA hingegen ist mit maximal 22 Basenpaaren kurz und besitzt auf der Länge der LNA die entsprechenden DNA-Basen. Aus diesem Grund sollte für die Anwendung, in der eine stabile Hybridisierung für eine erfolgreiche Markierung der Spermien erforderlich ist, die Inkubationstemperatur der Spermien auf maximal 30°C festgelegt werden. Die Standardinkubationstemperatur von 37°C würde in diesem Fall dazu führen, dass keine Hybridisierung erfolgen kann. Im weiteren Vorgehen bei der Sortierung der Spermien sollte die Temperatur ebenfalls nicht erhöht werden. Andernfalls würde die AuNP-LNA-Sonde denaturieren und die angestrebte Akkumulation der Partikel würde sich auflösen. Hierdurch würde die Differenzierung der Spermien nach ihrem Geschlecht erschwert oder unmöglich werden.

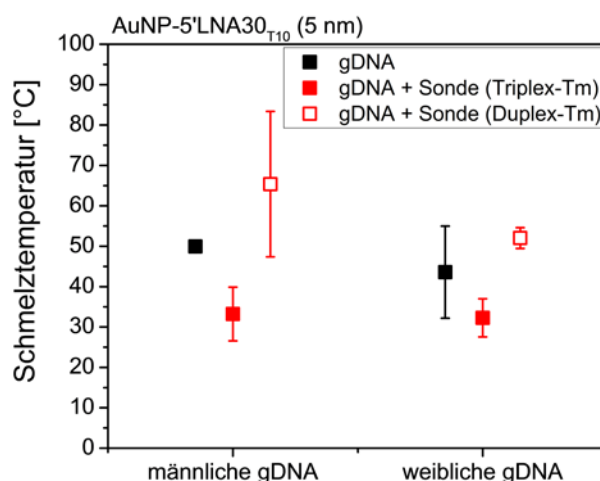


Abbildung 70: Hybridisierung von Goldnanopartikeln, welche mit LNA-Sonden funktionalisiert sind. Darstellung der Schmelztemperatur von AuNP-5'LNA30_{T10}-Konjugaten nach der Hybridisierung mit demembraniserten Spermienköpfen und genomischer DNA unter Verwendung von 5 nm großen Goldnanopartikeln. Die Graphik ist adaptiert nach Gamrad et al. [276].⁴⁰

Es wurde gezeigt, dass die Hybridisierung von AuNP-gekoppelten LNA-Liganden sowohl an synthetischen kurzen Sequenzen möglich ist, als auch an der größeren und unregelmäßigen Struktur der genomischen DNA. Die finale Analysemethode, mit der die Spermien nach ihrem Geschlecht sortiert werden sollen, beruht auf der Plasmonenkopplung von akkumulierten Goldnanopartikeln. Hierbei ist der Interpartikelabstand zwischen den Nanopartikeln so gering, dass eine gegenseitige Kopplung der Plasmonen auftritt und eine Rotverschiebung des Plasmonenpeaks resultiert. [67] Aus diesem Grund soll im Folgenden anhand der Hybridisierung

⁴⁰ Lisa Gamrad, Roberto Mancini, Daniel Werner, Daniela Tiedemann, Ulrike Taylor, Anna Zieffuß, Christoph Rehbock, Sabine Klein, Wilfried Kues, Stephan Barcikowski and Detlef Rath. Triplex-hybridizing bioconjugated gold nanoparticles for specific Y-chromosome sequence targeting of bull spermatozoa. *Analyst*, 2017, Accepted Manuscript. <http://dx.doi.org/10.1039/C6AN02461K>. Reproduced by permission of The Royal Society of Chemistry.

verschiedener AuNP-LNA-Sonden an genomischen DNA und demembranisierten Spermienköpfen die Verschiebung des SPR-Peaks untersucht werden.

Es wurden zwei LNA-Sequenzen und zwei verschiedene Partikelgrößen eingesetzt. Neben den selbst, mittels Laserablation hergestellten 5 nm Goldpartikeln wurden zusätzlich kommerziell erworbene 34 nm Goldnanopartikel der Firma Nanopartz™ eingesetzt. Der Grund hierfür ist, dass für das Erreichen einer Plasmonenkopplung die Distanz zwischen zwei Partikeln maximal das 2,5-fache des Partikeldurchmessers betragen sollte. [67, 69, 240] Dies beträgt bei 5 nm Partikeln 12,5 nm, während die Distanz bei 34 nm Partikel mit 87,5 nm 7-mal so hoch sein kann, um den gleichen Effekt zu erreichen. Für die 34 nm Goldnanopartikel ist hierfür demnach nicht unbedingt ein Interkalieren, also ein ineinander Einschieben, der 9 nm langen LNA-Sequenzen erforderlich. Die lasergenerierten kleineren Partikel wurden parallel getestet, um eventuell auftretende weitere Effekte zu untersuchen und einen Vergleich mit den 34 nm Partikeln zu ziehen.

Die Daten zur Verschiebung des SPR-Peaks sind in Abbildung 71 A dargestellt. Bei der Betrachtung der Hybridisierung mit genomischer DNA ist zu erkennen, dass die AuNP-5'LNA30_{T10}-Konjugate aus 5 nm großen Nanopartikeln mit $3,7 \pm 7,3$ nm für die männliche und mit $2,2 \pm 3,6$ nm für die weibliche DNA die größte SPR-Verschiebung aufweisen. Jedoch liegen die Werte der Standardabweichung hier bei 164-197%. Für 34 nm große Partikel liegt die Peakverschiebung bei $2,1 \pm 2,7$ nm (männlich) und $0,9 \pm 1,1$ nm (weiblich). Die Standardabweichung ist hier mit 122-128% geringer. Der Einsatz einer kürzeren Sequenz ohne Thymin-Spacer führt sowohl für männliche als auch für weibliche genomische DNA zu einer SPR-Verschiebung von $0,5 \pm 0,5$ nm. Dies liegt jedoch in dem Fehlerbereich des UV-Vis-Spektrometers von $\pm 0,8$ nm und ist von daher nicht signifikant.

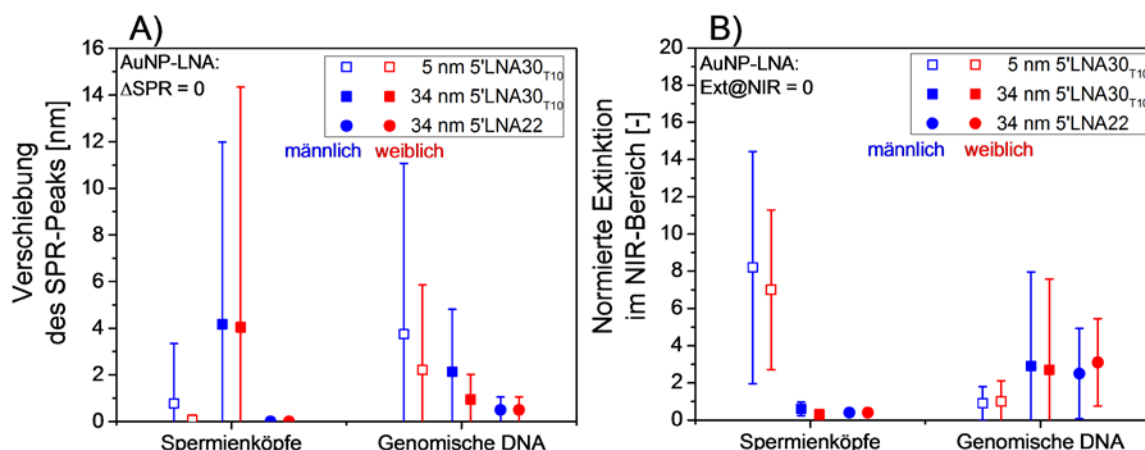


Abbildung 71: Hybridisierung von LNA-Sonden, welche an Goldnanopartikel gebunden wurden. Verschiebung des SPR-Peaks (A) und der normierten Extinktion im nahen Infrarot-Bereich (B) von AuNP-LNA-Konjugaten nach der Hybridisierung mit demembraniserten Spermienköpfen sowie genomischer DNA für 5 nm und 34 nm große Goldnanopartikel ebenso wie verschiedene LNA-Sequenzen. Teile der Ergebnisse stammen aus [276].⁴¹

Der gleiche Effekt ist auch bei den demembraniserten Spermienköpfen zu sehen, da hier für die Verwendung von 34 nm AuNP-5'LNA22 keine SPR-Verschiebung erkennbar ist. Die 34 nm Partikel mit 5'LNA30_{T10} hingegen weisen eine SPR-Verschiebung von $4,2 \pm 7,8$ nm (männlich) und $4,0 \pm 10,3$ nm (weiblich) auf. Unter Verwendung von 5 nm großen Partikeln werden nur Verschiebungen von $0,8 \pm 2,6$ nm (männlich) und $0,1 \pm 0,2$ nm (weiblich) erreicht. Die Werte der Standardabweichung sind bei den Ergebnissen der Hybridisierung mit demembraniserten Spermienköpfen teilweise bis zu dreimal größer als die entsprechenden Mittelwerte und übersteigen damit die Abweichung bei den Experimenten mit genomischer DNA. Aufgrund der Tatsache, dass bei diesem Experiment bis zu 38 Wiederholungen pro Probe erforderlich waren, um signifikante Ergebnisse zu erhalten, muss die Hybridisierung verschiedener AuNP-LNA-Sonden an biologisch relevante Spezies, wie genomische DNA und demembranierte Spermienköpfe, allgemein als schwer reproduzierbar eingestuft werden.

Neben dem Peak der Oberflächenplasmonenresonanz und dem Primärpartikelindex können aus einem UV-Vis-Spektrum von Goldnanopartikeln auch Informationen über auftretende Streueffekte aufgrund von großen Partikeln oder Agglomeraten ermittelt werden. In dem Wellenlängenbereich des nahen infraroten Lichtes (780 nm – 3 µm) tritt in diesem Fall eine erhöhte Extinktion auf. [241]

⁴¹ Lisa Gamrad, Roberto Mancini, Daniel Werner, Daniela Tiedemann, Ulrike Taylor, Anna Zieffuß, Christoph Rehbock, Sabine Klein, Wilfried Kues, Stephan Barcikowski and Detlef Rath. Triplex-hybridizing bioconjugated gold nanoparticles for specific Y-chromosome sequence targeting of bull spermatozoa. *Analyst*, 2017, Accepted Manuscript. <http://dx.doi.org/10.1039/C6AN02461K>. Reproduced by permission of The Royal Society of Chemistry.

Die Extinktion der hybridisierten Nanopartikel im nahen Infrarot-Bereich (hier 800 nm) des UV-Vis-Spektrums weist nicht die gleichen Effekte auf wie die Daten der Verschiebung des SPR-Peaks. (Abbildung 71 B) Zum einen sind bei allen Proben keine Unterschiede zwischen den männlichen und weiblichen Spezies zu erkennen. Zum anderen weisen hierbei die Sonden, welche aus 5 nm Partikel bestehen, bei der Hybridisierung mit den Spermienköpfen eine um das 16-20-fache der Streuung von den 34 nm Partikeln auf.

Bei der Hybridisierung mit genomischer DNA ist ebenfalls die Tendenz im Vergleich zu den Ergebnissen der SPR-Verschiebung gegenläufig. In diesem Fall sind die Werte der NIR-Extinktion für die 34 nm großen Partikel dreimal so hoch wie die der 5 nm großen Partikel. Die Werte der Standardabweichung sind jedoch ebenfalls sehr hoch und liegen bei der Hybridisierung mit demembraniserten Spermienköpfen bei 14 - 85%, wohingegen bei der Hybridisierung mit genomischer DNA die Abweichungen bei 76 - 181% liegen.

Eine mögliche Erklärung für die beschriebenen Ergebnisse und die auftretenden Abweichungen sowohl zwischen genomischer DNA und Spermienköpfen als auch zwischen der SPR-Peak-Verschiebung und der Extinktion im NIR-Bereich kann in der Struktur der biologischen Proben und der Anzahl an Nanopartikeln liegen. Wird eine Verschiebung des SPR-Peaks und eine Erhöhung der Extinktion im NIR-Bereich nach der Hybridisierung der AuNP-LNA-Sonden mit demembraniserten Spermienköpfen gemessen, so sind die Werte bei den entsprechenden Proben der genomischen DNA größer. Dies gilt bei den Daten der SPR-Peak-Analyse für die Sonde, welche aus 34 nm Partikeln und 5'LNA30_{T10} besteht, und bei der Auswertung der NIR-Extinktion für die Sonde aus 5 nm Partikeln mit 5'LNA30_{T10}.

Eine mögliche Ursache kann die festere Struktur der Spermienköpfe und dementsprechend auch des Chromatins sein. Die Partikel lagern sich an den Spermienköpfen an und diffundieren in die Struktur hinein. Diese ist jedoch sehr dicht, somit können die Partikel nur langsam durch die Matrix diffundieren. Hieraus kann einerseits ein großer und gleichmäßig über den Spermienkopf verteilter Interpartikelabstand resultieren, was ein Ausbleiben der Plasmonenkopplung und der SPR-Verschiebung zur Folge hätte. Auch die erhöhte Extinktion im NIR-Bereich wäre hierbei nicht zu beobachten. Andererseits ist aus den Daten ersichtlich, dass bei vereinzelten Proben (34 nm-5'LNA30_{T10}) eine Plasmonenkopplung auftritt. Hierbei ist

anzunehmen, dass diese Sonden durch die Matrix diffundiert sind und entweder unspezifisch in der Matrix akkumulieren oder spezifisch an die genomische DNA hybridisieren und dadurch eine Plasmonenkopplung bewirken. Die feste Struktur der Spermienköpfe, ebenso wie die Tatsache, dass Y-Chromosom tragende Spermien kleiner sind als X-Chromosom tragende [242], ist eine Erklärung für die ausbleibenden Unterschiede zwischen den Hybriden der männlichen und weiblichen Spezies.

Die genomische DNA ist in ihrer Struktur sehr viel flexibler als die Spermienköpfe. Es ist anzunehmen, dass die Partikel sich besser in der Probe und zwischen der DNA bewegen können und sich schlussendlich dort anlagern. Die Anlagerung der Partikel in der Matrix, welche beim Auslesen des SPR-Peaks für die Sonden mit 5'LNA30_{T10} und unter Ausschluss der Standardabweichung eine lokale Anbindung und damit zu einer geschlechtsspezifischen Differenzierung führt, kann beim Auslesen des Streuanteils im NIR-Bereich nicht differenziert werden.

Schussfolgernd ist zu erwähnen, dass die Daten aus der Verschiebung des SPR-Peaks und der Extinktion im NIR-Bereich einzeln und für die demembraniserten Spermienköpfe zwar gut zu interpretieren sind. Allerdings sind hier noch weitere Analysen insbesondere bezüglich der Lage der Sonden und dem Auftreten der Plasmonenkopplung notwendig, um fundierte Aussagen als Basis einer künftigen Anwendung treffen zu können.

Die bei den 5 nm AuNP-5'LNA30_{T10}-Konjugaten auftretende erhöhte NIR-Extinktion nach der Inkubation mit Spermienköpfen kann durch die erhöhte Anzahl der Partikel erklärt werden. Hierbei liegt mindestens das 10-fache der 34 nm Konjugate vor, was zu einer erhöhten NIR-Extinktion, jedoch nur zu einer geringen Verschiebung des SPR-Peaks führt. Es wurde bisher nicht näher auf die Verhältnisse von Partikelmenge zu genomischer DNA und Spermienköpfen eingegangen, weil es bei der Änderung der Verhältnisse keine Tendenz innerhalb der Datenreihen gibt. Dies wurde im Zuge der Auswertung der Experimente ermittelt. Aus diesem Grund wurden alle erhobenen Daten in die Auswertung einbezogen.

Die Auswertung des Streuanteils des UV-Vis-Spektrums der AuNP-LNA-Sonden, welche mit genomischer DNA und demembraniserten Spermienköpfen hybridisiert wurden, hat gezeigt, dass diese Analysemethode nicht zur geschlechtsspezifischen Markierung der Spermien eingesetzt werden kann. Des Weiteren wird hierbei nicht die reine Streuung der Partikel betrachtet, da mittels UV-Vis-Spektrometrie eine

Absorptionsmessung der Probe erfolgt und aus den vorliegenden Messdaten lediglich indirekt der Streuanteil ermittelt werden kann. Aus diesem Grund wurde exemplarisch anhand der 34 nm AuNP-5'LNA30_{T10}-Konjugate die Hybridisierung mit den beiden biologischen Proben durchgeführt und mittels Streulichtspektroskopie vermessen.

Die Ergebnisse aus Abbildung 72 entsprechen denen, welche als gefüllte Vierecke in Abbildung 71 dargestellt sind. Es ist zu erkennen, dass die bei der Extinktion im NIR-Bereich angedeutete Differenzierung zwischen männlich und weiblich bei der direkten Streulichtmessung deutlicher ausfällt. Die Unterschiede liegen hier bei 8% für die Spermienköpfe und bei 29% für die genomische DNA. Des Weiteren sind in beiden Varianten die Werte für die männlichen Spezies höher, dies deutet auf eine verstärkte Anlagerung der Sonden an die biologische Spezies hin. Der Streuanteil der Partikel ist hierbei für die genomische DNA stärker, dies wird durch die Theorie der verringerten Diffusionsfähigkeit in den demembraniserten Spermienköpfen bestätigt. Es ist anzumerken, dass es sich hierbei um normierte Werte handelt, bei der die normierte Extinktion der nicht hybridisierten AuNP-LNA-Sonde 1,0 beträgt. Die Streuung der Partikel in oder an den Spermienköpfen ist beinahe um die Hälfte geringer. Dies deutet auf die veränderte Umgebung der Partikel, wie beispielsweise des Brechungsindex, hin.

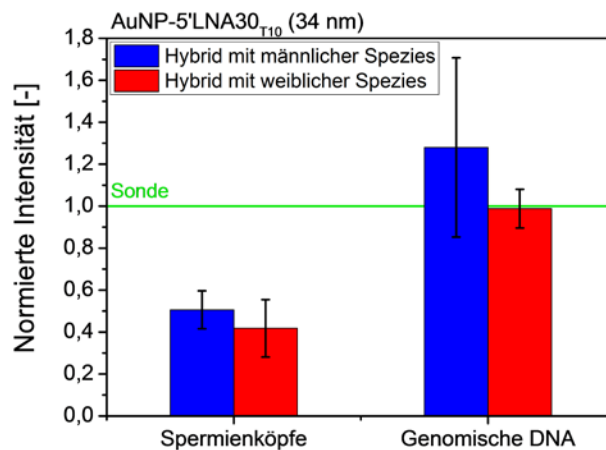


Abbildung 72: Hybridisierung von LNA-Sonden, welche mit Goldnanopartikeln funktionalisiert wurden. Darstellung der normierten Streu-Intensität berechnet aus den Flächen der gemessenen Streulicht-Spektren von AuNP-5'LNA30_{T10}-Konjugaten nach der Hybridisierung mit demembraniserten Spermienköpfen und genomischer DNA unter Verwendung von 34 nm großen Goldnanopartikeln.

Schließlich kann nach der Analyse der Hybridisierungsfähigkeit der hergestellten Sonden mit biologisch relevanten Proben zusammengefasst werden, dass grundsätzlich eine geschlechtsspezifische Anbindung der Sonden funktioniert. Hierbei ist jedoch die Reproduzierbarkeit verbesserungsfähig. Des Weiteren ist die Bindung der Sonden an die genomische DNA schwächer als an synthetische DNA, woraus eine

geringere Inkubations- und allgemeine Umgebungstemperatur der Spermien während der Sortierung von maximal 30°C resultiert. Von den ausgewählten Sequenzen scheint 5'LNA30_{T10} die bessere zu sein, weil hierbei in beiden Spezies eine SPR-Verschiebung erreicht wurde.

Die Analyse des Streuanteils ergab keine signifikanten Werte, während die direkte Streulichtmessung selbst signifikante Unterschiede zwischen männlichen und weiblichen Spezies ergab. Allerdings ist dies nicht mittels Signifikanzanalyse bestätigt worden. Bisher konnte nur bei der genomischen DNA eine geschlechtsspezifische Differenzierung erreicht werden, weil innerhalb der Spermienköpfe die Diffusion der Partikel durch die Matrix erschwert wurde und somit die SPR-Verschiebung weniger ausgeprägt war. Dies tritt zwar bei den größeren 34 nm Partikeln verstärkt auf, ist aber auch bei den 5 nm Partikeln schwach erkennbar. Hierbei wären kleinere Partikel notwendig, wobei dann jedoch das Konzept der Plasmonenkopplung überdacht werden müsste, da diese bereits mit 5 nm schwierig zu erreichen ist. Für diesen Zweck wären fluoreszente Goldcluster eine Möglichkeit zur Y-spezifischen Spermienmarkierung.⁴²

⁴² Weitere Ergebnisse sind ergänzend in Kapitel 7.8.11. im Anhang zu finden.

4.3.4. Analyse der Aufnahmefähigkeiten von Goldnanopartikel-Konjugaten in regulatorischen T-Zellen und deren Nutzung zur Transfektion



Die Experimente, welche in dem folgenden Kapitel beschrieben werden, erfolgten in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Wiebke Hansen vom Institut für Medizinische Mikrobiologie des Universitätsklinikums Essen. Die Herstellung der Nanopartikel-Proben einschließlich der Charakterisierung, sowie der Durchführung der konfokalmikroskopischen Aufnahmen wurden von mir durchgeführt. Die Experimente und Auswertung der Nanopartikelaufnahme in die Zellen und der Transfektion wurden von Prof. Dr. Wiebke Hansen und ihrem Team durchgeführt.

Des Weiteren basiert dieses Kapitel auf einem Manuskript, welches in dem Journal *Scientific Reports* veröffentlicht wurde.⁴³ [209]

Das Ziel dieser Studie war die Penetration von Goldnanopartikel-Biokonjugaten in primäre, murine T-Zellen. Weiterhin sollte eine Funktionalität dieser Spezies innerhalb der Zellen gezeigt werden. Hierfür ist ein spezieller Entwurf der biofunktionellen Spezies notwendig, bei dem die Funktionalität individuell gestaltet werden kann. Eine Plattform für diesen Zweck bieten die in Kapitel 4.1 beschriebenen Goldnanopartikel mit einer Größe von $5,2 \pm 0,7$ nm. Diese Nanopartikel wurden mit einem thiolisierten NLS_{Cys}-Peptid funktionalisiert, welches die Eigenschaft hat, die Zellmembran zu durchdringen und somit in das Innere der Zelle zu gelangen. [151]

Des Weiteren wurden die Goldnanopartikel mit einem Oligonukleotid konjugiert, um die Partikel vor einer Agglomeration während der Peptidkonjugation zu stabilisieren. Es wurde ein LNA-Oligonukleotid (5'LNA22) verwendet, welches rigider ist als ein DNA-Oligonukleotid und auf diese Weise mit weniger Liganden die Nanopartikel ausreichend stabilisieren kann. Gleichzeitig bleibt genügend Platz auf der Partikeloberfläche für die Anbindung des NLS_{Cys}-Peptids und eines weiteren funktionellen Moleküls. [151] Beide Moleküle sind kovalent über die Thiol-Bindung auf den Nanopartikeln gebunden, um eine bessere Stabilisierung und ein definiertes System mit bekannten Bedingungen zu erhalten. Die verbesserte Stabilität aufgrund

⁴³ Gamrad, L.; Rehbock, C.; Westendorf, A. M.; Buer, J.; Barcikowski, S.; Hansen, W.; Efficient nucleic acid delivery to murine regulatory T cells by gold nanoparticle conjugates; *Scientific Reports*, **2016**, 6:28709; 1-8.

der Thiol-Bindung zeigt der Vergleich mit einem nicht thiolisierten Peptid. (Kapitel 4.2.2; Anhang: Abbildung 207) Die Nanopartikel-Oligonukleotid-Peptid-Konjugate in den nachfolgend beschriebenen Experimenten haben durchschnittlich $7,9 \pm 1,7$ LNA und $29,7 \pm 0,1$ NLS_{Cys} pro Goldnanopartikel auf der Oberfläche, was zu stabilen Biokonjugaten mit einem hydrodynamischen Partikeldurchmesser von $16,6 \pm 4,0$ nm führt. (Anhang: Abbildung 206 B) Der größere Partikeldurchmesser im Vergleich zu den Primärpartikeln ist auf die Ligandenhülle der Oligonukleotide und Peptide zurückzuführen. Der Primärpartikelindex PPI dieser Konjugate liegt bei $16,4 \pm 2,0$ (Anhang: Abbildung 206 A) und das Zetapotential beträgt $-48,1 \pm 2,4$ mV (Anhang: Abbildung 209), dies deutet im Vergleich zu reinen Peptidkonjugaten (Kapitel 4.2.2) mit beispielsweise einem PPI von 5 auf eine gute kolloidale Stabilität aufgrund der LNA hin. (Anhang: Abbildung 210)

Aufnahme von Goldnanopartikel-Konjugaten durch murine Milzzellen

Zunächst wurde analysiert, ob die AuNP-LNA-NLS_{Cys} Konjugate mit verschiedenen murinen Immunzellen wechselwirken. Bei diesem Experiment wurde ein AlexaFluor488-markiertes Oligonukleotid bei der Konjugation verwendet, um die Nanopartikel-Konjugate nach der Inkubation bei verschiedenen Konzentrationen mit den Splenozyten detektieren zu können. Die Splenozyten (CD11b⁺ Makrophagen, CD11c⁺ Dendritische Zellen, CD4⁺CD25⁺ regulatorische T-Zellen, CD8⁺ T-Zellen, CD4⁺CD25⁻ T-Zellen, CD19⁺ B-Zellen) wurden für dieses Experiment von BALB/c-Mäusen frisch isoliert und für vier Stunden mit den Konjugaten inkubiert. Anschließend wurde der Anteil an Alexa488-positiven, lebenden Zellen mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 73 dargestellt.

Erwartungsgemäß zeigen die CD11b⁺ Makrophagen und CD11C⁺ dendritischen Zellen (DCs) die höchste Aufnahme an Goldnanopartikel-Konjugaten in Abhängigkeit von der Anzahl an AuNP/Zelle. (Abbildung 73 A und B) Dies kann mit der natürlichen endozytischen Aktivität begründet werden, welche bereits in Form der Pinozytose oder rezeptorbezogenen Endozytose zu einer effizienten Aufnahme von Goldnanopartikeln in Makrophagen und DCs beschrieben wurde. [243, 244]

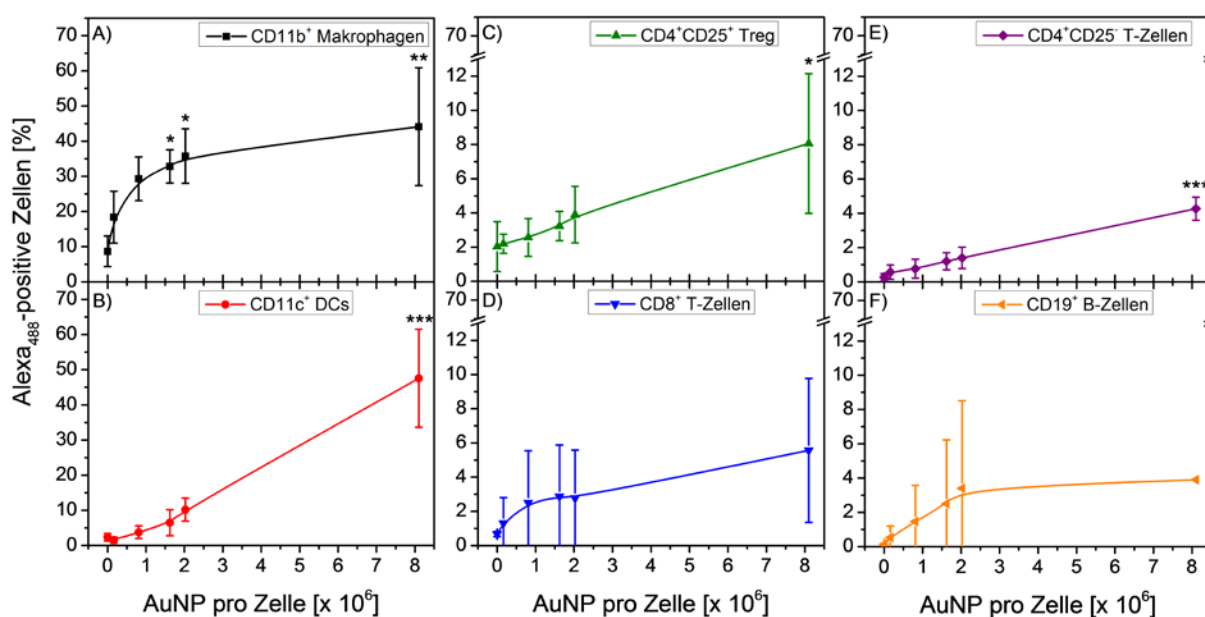


Abbildung 73: Aufnahme von Goldnanopartikel-Konjugaten. Murine Splenozyten wurden in Anwesenheit und Abwesenheit von $0,16 \cdot 10^6$, $0,81 \cdot 10^6$, $1,62 \cdot 10^6$, $2,03 \cdot 10^6$ oder $8,1 \cdot 10^6$ Alexa488-markierten Nanopartikel-Konjugaten pro Zelle vier Stunden inkubiert. Die Menge an Alexa488 positiven Zellen wurde bezüglich der lebenden Teilmenge A) CD11b⁺ Makrophagen, B) CD11c⁺ DCs, C) regulatorische T-Zellen CD25⁺, D) CD8⁺ T-Zellen, E) CD4⁺ T-Zellen und F) CD19⁺ B-Zellen mittels FACS bestimmt. Es wurde eine Varianzanalyse mit nachfolgendem Dunnett-Test durchgeführt, um die statistische Relevanz zu ermitteln. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Die Graphik ist adaptiert nach Gamrad et al. [209].⁴⁴

Bei dem Einsatz von $8,1 \cdot 10^6$ Konjugaten pro Zelle zeigen CD8⁺ T-Zellen und CD19⁺ B-Zellen eine Anlagerung oder Aufnahme in 3 - 5% der lebenden Zellen. (Abbildung 73 D und F) Innerhalb der Gruppe der CD4⁺ T-Zellen liegt das Signal der Alexa488-positiven Zellen bei den CD25⁻-exprimierenden regulatorischen T-Zellen bei 8 - 10%. Bei den CD4⁺CD25⁻ T-Zellen hingegen wurde nur ein Wert von 5% ermittelt. (Abbildung 73 C und E)

Im Allgemeinen weisen diese Ergebnisse darauf hin, dass alle untersuchten Immunzellen mit den verwendeten AuNP-LNA-NLS_{Cys}-Konjugaten in Abhängigkeit der eingesetzten Dosis wechselwirken. Allerdings kann bei der Untersuchung mittels FACS keine Aussage darüber getroffen werden, ob die Nanopartikel-Konjugate sich nur an der Oberfläche der Zellen befinden oder aufgenommen wurden und innerhalb der Zellen zu finden sind. Über diese Problematik kann die Konfokalmikroskopie Aufschluss geben.

Abbildung 74 zeigt die konfokalmikroskopische Untersuchung von AuNP-LNA-NLS_{Cys}-Konjugaten, welche mit regulatorischen T-Zellen CD4⁺CD25⁺ (Tregs) inkubiert wurden. Es ist ersichtlich, dass die Konjugate, dargestellt in grün, nicht nur außerhalb

⁴⁴ Lisa Gamrad, Christoph Rehbock, Astrid M. Westendorf, Jan Buer, Stephan Barcikowski and Wiebke Hansen. Efficient nucleic acid delivery to murine regulatory T cells by gold nanoparticle conjugates. *Sci. Rep.*, 6:28709: 1 – 8, 2016. <http://dx.doi.org/10.1038/srep28709>. This figure is used under CC BY 4.0 / Adapted from original.

der Zellen an der Oberfläche (hellblau in Abbildung 74 B) akkumuliert vorliegen, sondern ebenfalls innerhalb der Zellen zu finden sind. Dem dargestellten Querschnitt der Zelle kann entnommen werden, dass die Nanopartikel über die gesamte Zelle verbreitet vorliegen. Es befinden sich vereinzelt intensivere Bereiche auf der inneren Seite der Zellmembran. Dies deutet auf eine verstärkte Akkumulation der Konjugate außerhalb des Zellkerns in beispielsweise Endosomen hin. Ein weiterer Beweis der erfolgreichen Nanopartikel-Aufnahme wird durch die Abbildung der z-Achse gegeben. Hierbei ist die intrazelluläre Verteilung der Nanopartikel über den gesamten abgebildeten Bereich der Zelle deutlich zu erkennen. (Anhang: Abbildung 211)

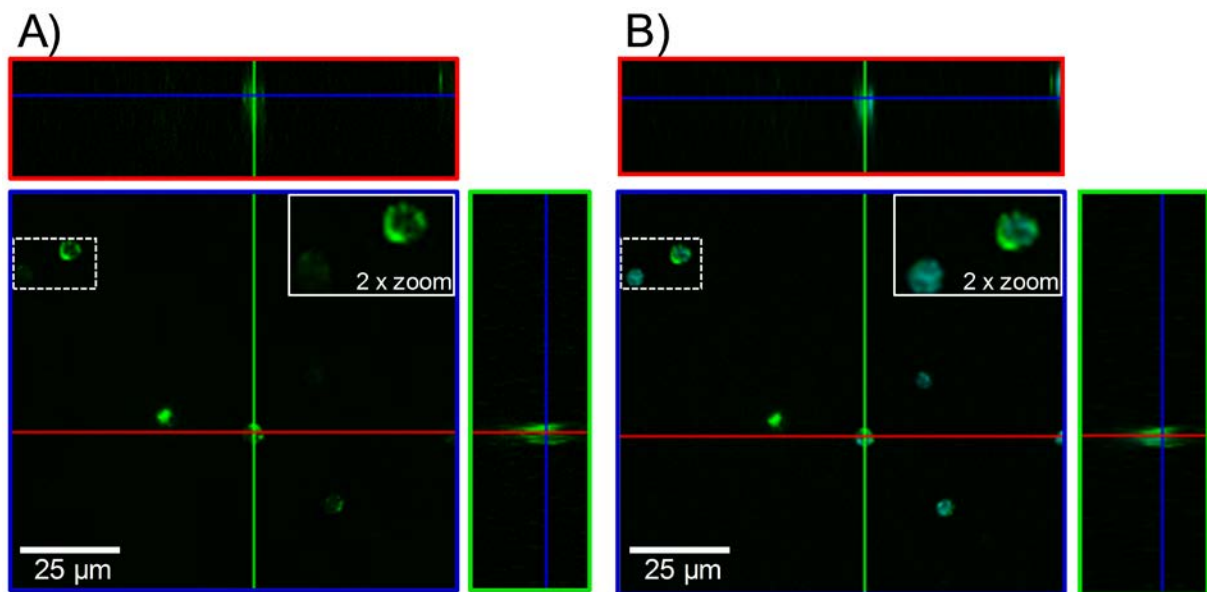


Abbildung 74: Konfokalmikroskopische Aufnahmen von AuNP-LNA-NLS_{Cys}-Konjugaten, welche von regulatorischen T-Zellen CD25⁺ aufgenommen wurden. Darstellung der Nanopartikel durch eine Markierung der Liganden mit Alexa₄₈₈ in grün. (A); Darstellung der Nanopartikel-Konjugate (grün), welche in regulatorische T-Zellen aufgenommen wurden. Die Zellen sind DAPI-gefärbt und blau dargestellt. (B) Die Graphik wurde von Gamrad et al. [209] übernommen.⁴⁵

Um die Analyse der Konjugat-Aufnahme von frisch isolierten T-Zellen mittels Konfokalmikroskopie zu bestätigen und die intrazelluläre Lokalisierung besser zu zeigen, wurden zusätzlich Aufnahmen mittels Transmissionselektronenmikroskopie durchgeführt. Hierbei wurde eine Akkumulation der Partikel in intrazellulären Vesikeln der CD4⁺ T-Zellen ermittelt (Abbildung 75), dies wurde bereits für murine dendritische Zellen beschrieben. [243] Aufgrund der Tatsache, dass CD4⁺ T-Zellen tentakel-ähnliche Strukturen auf ihrer Oberfläche aufweisen, wird hierbei Endozytose vermutet. Aufgrund der geringen Größe kann Pinozytose [245] vorliegen, bei der die Partikel

⁴⁵ Lisa Gamrad, Christoph Rehbock, Astrid M. Westendorf, Jan Buer, Stephan Barcikowski and Wiebke Hansen. Efficient nucleic acid delivery to murine regulatory T cells by gold nanoparticle conjugates. *Sci. Rep.*, 6:28709: 1 – 8, 2016. <http://dx.doi.org/10.1038/srep28709>. This figure is licensed under CC BY 4.0.

schließlich in Strukturen, welche denen von Endosomen ähneln, aufzufinden sind. Für eine genaue Analyse des Aufnahmemechanismus der Nanopartikel in murine T-Zellen sind weitere Untersuchungen notwendig. Trotzdem wurde herausgefunden, dass Goldnanopartikel-Konjugate effizient von murinen, primären CD4⁺ T-Zellen aufgenommen werden.

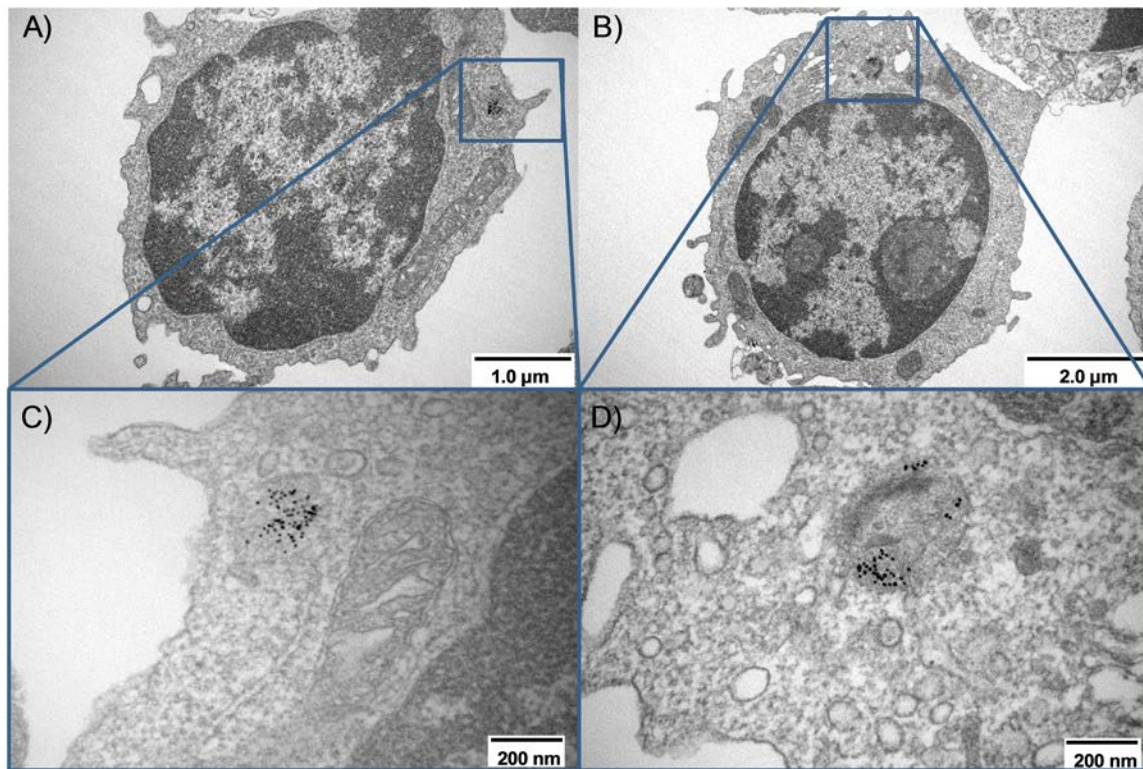


Abbildung 75: Nanopartikel, welche in Vesikeln der T-Zellen aufgenommen wurden. Übersicht der Zelle zur Darstellung der Lage der Vesikel. (A, B); Vergrößerung des Vesikels, um die Lage der Nanopartikel deutlicher zu erkennen. (C, D) Die Graphik ist adaptiert nach Gamrad et al. [209].⁴⁶

Herunterregulieren der GFP-Expression in murinen, regulatorischen eGFP⁺ T-Zellen durch Zugabe von siRNA-gekoppelten Nanopartikeln

Für die Einstufung der eingesetzten Konjugate bezüglich ihrer Eigenschaft als Träger für Nukleinsäuren in regulatorische T-Zellen, um hier die Genexpressionsprofile dieser Zellen zu regulieren, wurden die AuNP-LNA-NLS_{Cys}-Konjugate zusätzlich mit einer siRNA über elektrostatische Wechselwirkungen funktionalisiert. Die siRNA soll hierbei gegen eGFP gerichtet werden. Für diesen Ansatz wurden eGFP-exprimierende Tregs, welche aus Foxp3/eGFP-Reporter-Mäusen frisch isoliert wurden, mit den siRNA-gekoppelten Konjugaten inkubiert. Die eGFP-Expression der T-Zellen abhängig von

⁴⁶ Lisa Gamrad, Christoph Rehbock, Astrid M. Westendorf, Jan Buer, Stephan Barcikowski and Wiebke Hansen. Efficient nucleic acid delivery to murine regulatory T cells by gold nanoparticle conjugates. *Sci. Rep.*, 6:28709: 1 – 8, 2016. <http://dx.doi.org/10.1038/srep28709>. This figure is licensed under CC BY 4.0.

der Inkubationszeit und der Dosis wurde signifikant herunter reguliert. Im Vergleich hierzu zeigten die Konjugate ohne siRNA keine Veränderung der eGFP-Expression. (Abbildung 76, Anhang: Abbildung 212)

Die Inkubation der eGFP⁺ Tregs mit $1,6 \cdot 10^6$ der AuNP-LNA-NLS_{Cys}-siRNA pro Zelle weist nach zwei Tagen eine signifikante Reduktion der eGFP-Expression von 8,7% auf, welche nach dem dritten Tag einen um 18,3% niedrigeren Wert erzielt. (Abbildung 76) Unter der Verwendung von $3,2 \cdot 10^6$ Konjugaten pro Zelle wurde nach zwei Tagen eine Reduktion der eGFP-Expression von 36% und nach drei Tagen eine Reduktion von 48,8% in lebenden murinen Tregs ermittelt. Dies ist auffällig, weil in dem vorherigen Experiment eine Aufnahme der Konjugate von lediglich 10% dieser Zellen beobachtet wurde. Dieser Unterschied kann zum einen durch die unterschiedlichen Inkubationszeiten von zwei und drei Tagen bei dem Transfektionsexperiment im Vergleich zu vier Stunden bei der Aufnahme erklärt werden. Zum anderen wurden im ersten Fall aufgereinigte eGFP⁺-exprimierende Tregs verwendet. Bei dem Experiment zur Konjugat-Aufnahme wurde die gesamte Menge der Splenozyten eingesetzt.

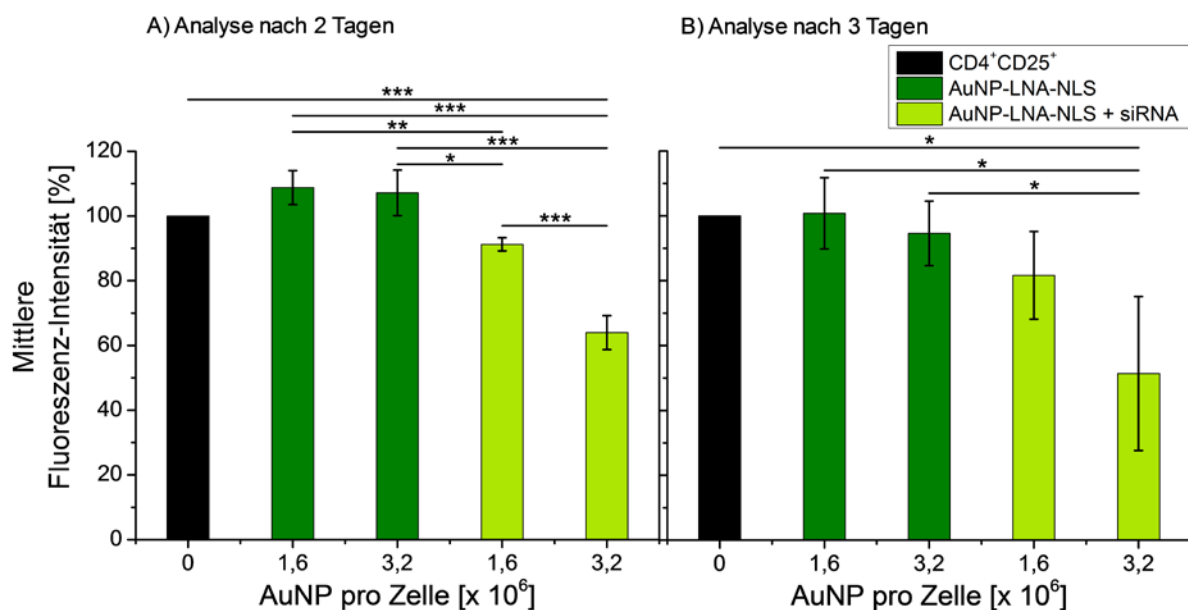


Abbildung 76: Herunterregulierung der eGFP-Expression in murinen eGFP⁺ regulatorischen T-Zellen durch siRNA-gekoppelte Goldnanopartikel-Konjugate. Frisch isolierte eGFP⁺ regulatorische T-Zellen wurden mit siRNA-gekoppelte Nanopartikel-Konjugate ($0 \cdot 10^6$; $1,6 \cdot 10^6$ und $3,2 \cdot 10^6$ Partikel pro Zelle) und mit Konjugaten ohne siRNA als Kontrolle inkubiert. Die eGFP-Expression wurde als mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der lebenden Zellen mittels Durchflusszytometrie nach zwei Tagen (A) und nach drei Tagen (B) untersucht. Der Messwert wurde als prozentualer Anteil der unbehandelten CD25⁺ Zellen (= 100%) berechnet. Es wurde eine Varianzanalyse mit nachfolgendem Bonferroni's-Test durchgeführt, um die statistische Relevanz zu ermitteln. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Die Graphik ist adaptiert nach Gamrad et al. [209].⁴⁷

⁴⁷ Lisa Gamrad, Christoph Rehbock, Astrid M. Westendorf, Jan Buer, Stephan Barcikowski and Wiebke Hansen. Efficient nucleic acid delivery to murine regulatory T cells by gold nanoparticle conjugates. *Sci. Rep.*, 6:28709: 1 – 8, 2016. <http://dx.doi.org/10.1038/srep28709>. This figure is used under CC BY 4.0 / Adapted from original.

Anhand der vorliegenden Ergebnisse und aufgrund der Tatsache, dass bei der TEM-Analyse keine Nanopartikel innerhalb des Zellkerns gefunden wurden, ist zu vermuten, dass die physisorbierte siRNA innerhalb der Vesikel von dem Nanopartikel gelöst wurde und somit durch die Membran in das Zytoplasma gelangen kann.

Eine erfolgreiche Transfektion von T-Lymphozyten mit Plasmiden oder siRNA-Konstrukten wurde bereits durch andere Wissenschaftler erreicht. So zum Beispiel unter Verwendung der transienten plasmonischen Nanoblasen-Injektion [246] oder mittels optimierter Elektroporationsprotokolle basierend auf Nukleofektionstechniken der Firma Lonza. Hierbei wurde eine Reduktion der Gen-Expression bei primären, humanen Lymphozyten von 40 - 60% erzielt. Dies gelang nur bei einem geringen Anteil an primären murinen T-Zellen von 10%. [247, 248]

Bei der Transfektion von murinen Lymphozyten mittels Elektroporation wird für das Erreichen einer Transfektionswirksamkeit von bis zu 40 - 60% eine Aktivierung durchgeführt. [248, 249] Dies beeinflusst die molekularen und funktionellen Eigenschaften dieser Zellen stark, was bei vielen Ansätzen unerwünscht ist. Da bei den hier gezeigten Experimenten keine Aktivierung der Zellen erforderlich ist, kann geschlossen werden, dass Goldnanopartikel effiziente Transportmaterialien für das Einbringen von Nukleinsäuren in unstimulierte murine regulatorische T-Zellen sind und den derzeitigen Elektroporationsmethoden überlegen sind.

Im Zuge der Transfektionsexperimente wurde nach der Inkubation der frisch isolierten murinen Tregs mit den AuNP-LNA-NLS_{Cys}-siRNA eine vermehrte Anzahl an toten Zellen gefunden. Dies trat sowohl in Abhängigkeit der Zeit als auch der Dosis auf, wobei die Werte bei ~60 - 80% liegen. (Anhang: Abbildung 213) Hierbei ist zu erwähnen, dass die Konjugate ohne siRNA keinen Einfluss auf das Überleben der Zellen haben.

Es kann demnach ausgeschlossen werden, dass die AuNP-LNA-NLS_{Cys}-Konjugate selbst toxische Nebeneffekte auf murine T-Zellen haben und die Toxizität aufgrund der im Allgemeinen antiproportional verlaufenden Relation mit der Transfektion durch das Einbringen des genetischen Materials in die Zelle auftritt. [35, 54] Der Grund für den auftretenden Zelltod beim Einsatz von siRNA-gekoppelten Konjugaten ist unklar, es kann jedoch vermutet werden, dass dies durch die Verwendung von BSA in diesen Experimenten verbessert werden kann. [8, 9] Im Vergleich hierzu ist zu erwähnen, dass auch der siRNA-Transfer in unstimulierte T-Zellen mit Hilfe von optimierten

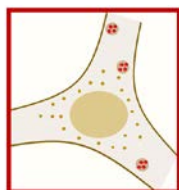
Transfektionsmethoden eine sehr geringe Überlebensrate von 15-28% aufweist. [250] Es ist eine weitere Optimierung bezüglich der Zellviabilität und der Wirksamkeit der Herunterregulation der Gen-Expression erforderlich. Dies kann beispielsweise mittels alternativer siRNA-Sequenzen validiert werden.

Zusammenfassend gilt, dass laserbasierte Goldnanopartikel-Konjugate eine geeignete Spezies sind, um murine regulatorische T-Zellen zu penetrieren und als effiziente Transporter für Nukleinsäuren verwendet zu werden. Dies wurde mittels verschiedener Analysemethoden wie FACS, Konfokal- und Transmissionselektronenmikroskopie, sowie dem Herunterregulieren der eGFP-Expression mittels siRNA, belegt.

Dieser Ansatz trägt dazu bei, dass die Gen-Expression in primären Tregs reguliert wird und somit Proteine und microRNAs, welche den Phänotyp und die Funktion dieser Zellen bestimmen, zu identifizieren. Diese Experimentenreihe zeigt den *Proof-of-Principle* für den Einsatz von Goldnanopartikel-Konjugaten bei dem Transport von Nukleinsäuren in unstimulierte primäre murine Tregs mit bemerkenswerten Effizienzen. Darüber hinaus sind weitere Ansätze zur Verbesserung der Nanopartikel-Konjugate im Hinblick auf die Toxizität und der Transfektionseffizienz denkbar.⁴⁸

⁴⁸ Weitere Ergebnisse sind ergänzend in Kapitel 7.8.12. im Anhang zu finden.

4.3.5. Endosomale Aufnahme und gezielte Freisetzung von Goldnanopartikel-Konjugaten



Die in Kapitel 4.2.2 hergestellten Konjugaten sind Nanopartikel-Agglomerate, welche mit den zellpenetrierenden thiolisierten Peptiden NLS_{Cys} und CWR₁₀ hergestellt wurden. Wie bereits in den theoretischen Grundlagen erwähnt, handelt es sich bei dieser Peptidgruppe um Sequenzen, welche bekannt dafür sind, die Zellmembran zu penetrieren und dabei Moleküle und Nanopartikel mit in das Innere der Zelle zu transportieren. Des Weiteren entstehen bei der Konjugation mit Goldnanopartikeln Agglomerate, welche aufgrund ihrer Größe die endosomale Aufnahme triggern. [245, 251, 252] In Bezug auf medizinische Anwendungen ist die Verwendung dieser AuNP-Peptid-Agglomerate zum Einbringen von beispielsweise Medikamenten in die Zellen ein möglicher Ansatz. Eine gezielte Freisetzung ist neben der effizienten Aufnahme ebenfalls von Bedeutung. Diese kann mittels Laserbestrahlung spezifisch bezüglich Zeit und Ort erfolgen.

Dieser Ansatz war Bestandteil einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Alexander Heisterkamp (Institut für Angewandte Optik, Friedrich-Schiller-Universität Jena; jetzt Institut für Quantenoptik, Leibniz Universität Hannover). Die Partikelherstellung und Analyse vor und nach der Laserbestrahlung ohne biologische Zellen wurden von mir durchgeführt. Alle Experimente mit biologischen Zellen inklusive der Laserbestrahlung wurden von Dipl. Phys. Judith Krawinkel (AK Heisterkamp) durchgeführt und ausgewertet. Die bei dieser Kooperation entstandenen Ergebnisse mit Agglomeraten aus CWR₁₀ und NLS_{Cys} sind Bestandteil einer Publikation⁴⁹, welche in dem *Journal of Nanobiotechnology* veröffentlicht wurde, und sollen im Folgenden vorgestellt werden.

Zelluläre Aufnahme der Agglomerate

Zu Beginn der Studie wurde die Aufnahme unter Verwendung von AuNP-CWR₁₀-Konjugaten in ZMTH3-Zellen untersucht. Dieser Zelltyp stammt von einem spontan auftretenden Mamma Karzinom (Brustkrebs). Bei der Aufnahme wurde sowohl die

⁴⁹ Krawinkel, J.; Richter, U.; Torres-Mapa, M. L.; Westermann, M.; Gamrad, L.; Rehbock, C.; Barcikowski, S. & Heisterkamp, A.; Optical and electron microscopy study of laser-based intracellular molecule delivery using peptide-conjugated photodispersible gold nanoparticle agglomerates; *J. Nanobiotechnol.*, **2016**, 14, 1-14.

Konzentration der Agglomerate (1,23 mg/L, 2,46 mg/L, und 4,92 mg/L) als auch die Inkubationsdauer (0,5, 1, 2, 3, 4, 6 und 24 Stunden) variiert. (Abbildung 77 A) Es ist zu erkennen, dass die Aufnahme nicht, wie erwartet, bei allen Proben mit erhöhter Partikelkonzentration und Inkubationsdauer ansteigt. Die beste Aufnahme der Agglomerate konnte bei einer Inkubationsdauer von vier Stunden und 4,92 mg/L AuNP-CWR₁₀ gefunden werden. Für längere Inkubationsdauern sowie für 1,23 mg/L nach 4 h und für 2,46 mg/L nach 3 h ist eine verringerte Aufnahme zu erkennen. Dies kann auf Exozytose zurückgeführt werden. [124, 253, 254] Die Aufnahme von unkonjugierten und deshalb nicht agglomerierten Primärpartikeln weist keine signifikante Aufnahme auf.

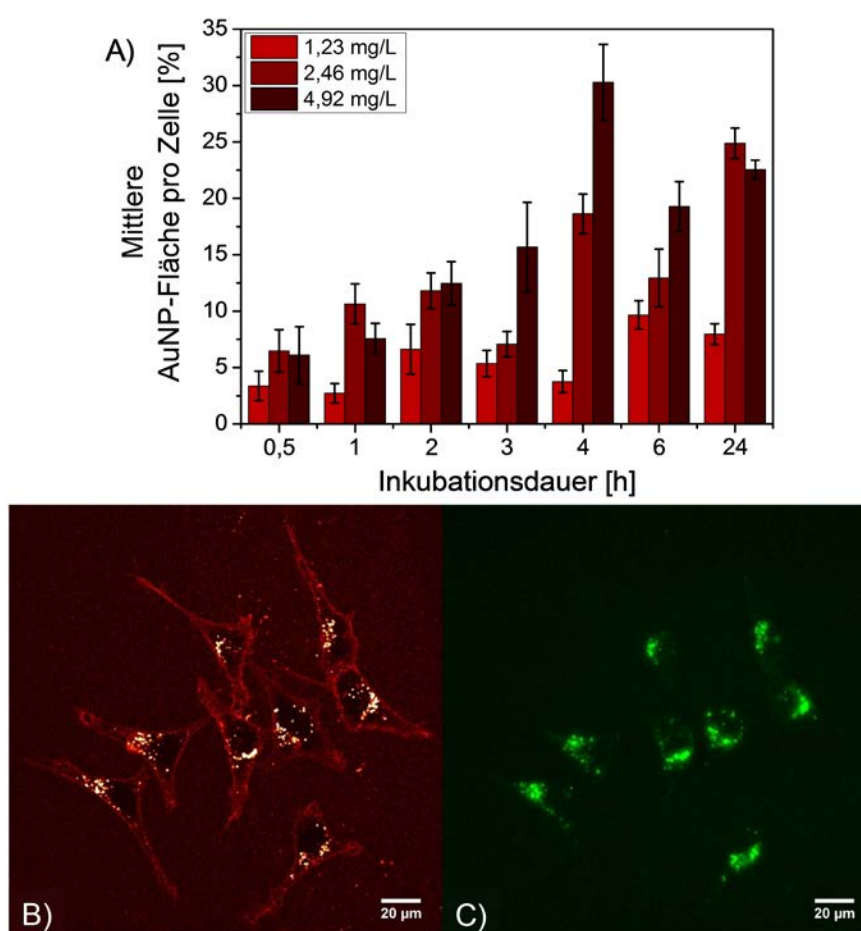


Abbildung 77: Aufnahme von AuNP-CPP-Konjugaten in ZMTH3-Zellen. Darstellung der mittleren AuNP-Fläche pro Zelle in Abhängigkeit der Inkubationsdauer für verschiedene Nanopartikel-Konzentrationen. Die Ermittlung der Daten ist in Kapitel 7.2.4.2 beschrieben. (A) Multiphotonenmikroskopie-Bilder: Anregung bei 1050 nm zeigt die Zellmembran, welche mit CellMask Orange angefärbt wurde, und die Lumineszenz der Konjugate. C) Darstellung der Lumineszenz von AuNP-CPP-Konjugaten, welche bei 720 nm angeregt wurden und bei der die Zellmembran nicht angeregt wird. (B) Die Abbildung ist adaptiert nach Gamrad et al. [72].⁵⁰

⁵⁰ Adapted with permission from Lisa Gamrad, Christoph Rehbock, Judith Krawinkel, Bayaraah Tumursukh, Alexander Heisterkamp and Stephan Barcikowski. Charge Balancing of Model Gold-Nanoparticle-Peptide Conjugates Controlled by the Peptide's Net Charge and the Ligand to Nanoparticle Ratio. *J. Phys. Chem. C*, 118 (19), 10302 – 10313, 2014. Copyright 2014 American Chemical Society. (<http://dx.doi.org/10.1021/jp501489t>)

Abbildung 77 B und C zeigt Multiphotonenmikroskopie-Aufnahmen von ZMTH3-Zellen, welche Agglomerate (24 h; 4,92 mg/L) über Endozytose aufgenommen haben. Zum einen sind sowohl die Agglomerate als auch die Zellmembran zu erkennen. Diese wurde mittels CellMask Orange angefärbt, wodurch sie bei einer Anregung von 1050 nm zu sehen ist. (Abbildung 77 B) Es ergibt sich eine Überlagerung der Partikel, weil dessen Zwei-Photonen-Lumineszenz bei 1050 nm ebenfalls sichtbar ist. Aufgrund der starken Absorption der Partikel-Agglomerate können diese ebenfalls bei 720 nm angeregt werden, bei dieser Wellenlänge fluoresziert der Farbstoff der Zellmembran nicht mehr. (Abbildung 77 C)

Anhand von TEM-Aufnahmen wird bestätigt, dass die Agglomerate über Endozytose aufgenommen werden. (Abbildung 78) Die Agglomerate befinden sich in Endosomen, welche über das gesamte Zytoplasma verbreitet vorliegen. Es sind hauptsächlich mehr als nur ein Agglomerat (Abbildung 78 A: Vergrößerung) in den Endosomen zu finden, wo sie in kondensierter Form vorliegen. Insbesondere in den späten Endosomen (LE; engl.: late endosome) wird der Eindruck erweckt, als würden die Agglomerate abgerundet und mit weniger Ausläufern als bei freien Agglomeraten vorliegen. (Anhang: Abbildung 215 B) Werden die Agglomerate nicht aus den Endosomen freigesetzt, bleiben sie über die verschiedenen Reifungsgrade hinweg in den Endosomen. Im Zellkern der Zellen wurden keine Nanopartikel gefunden.

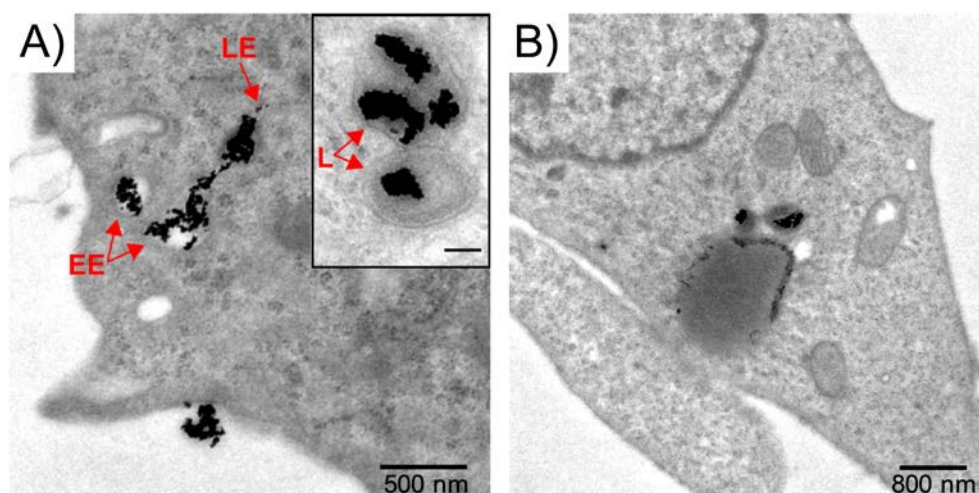


Abbildung 78: TEM-Aufnahmen von AuNP-CPP-Konjugaten, welche in ZMTH3-Zellen mittels Endozytose aufgenommen wurden. A) Goldnanopartikel befinden sich in Endosomen verschiedener Reifegrade der Zellen. (EE: frühe Endosomen; LE: späte Endosomen; L: Lysosomen) Maßbalken der Vergrößerung: 100 nm. B) Überblick einer Zelle mit einem Endosom, welches mit Nanopartikeln gefüllt ist. Die Abbildung ist adaptiert nach Krawinkel et al. [223].⁵¹

⁵¹ Judith Krawinkel, Undine Richter, Maria Leilani Torres-Mapa, Martin Westermann, Lisa Gamrad, Christoph Rehbock, Stephan Barcikowski and Alexander Heisterkamp. Optical and electron microscopy study of laser-based intracellular molecule delivery using peptide-conjugated photodispersible gold nanoparticle agglomerates. *J. Nanobiotechnol.*, 14 (2):1 – 14, 2016. <http://dx.doi.org/10.1186/s12951-015-0155-8>. This figure is used under CC BY 4.0 / Adapted from original.

Der Aufnahmemechanismus der Endozytose eignet sich des Weiteren, weil die Größe der Goldnanopartikel-Agglomerate von 40 - 60 nm (Anhang: Abbildung 215 A und Abbildung 216) in dem optimalen Bereich von 54 - 60 nm liegt. [255] Agglomerate sind innerhalb der Endosomen anders angeordnet als im freiem Zustand. Darüber hinaus liegen sie stärker kondensiert vor. Aufgrund dieser Beobachtung kann angenommen werden, dass die Agglomeration ein flexibler Zustand der Partikel ist und diese sich in Abhängigkeit von ihrer Umgebung anordnen können. Der Interpartikelabstand scheint weiter reduziert werden zu können.

Molekülfreisetzung und Bestimmung der optimalen Laserfluenz

Aufgrund der Tatsache, dass die Partikel-Agglomerate sich über den Reifungsprozess der Zellen in den Endosomen befinden und nicht natürlich freigesetzt werden, besteht die Gefahr der Degradation von biologischen Liganden um die Partikel. Diese Degradation kann durch Proteolyse erfolgen, weil die Menge der Proteasen während der Reifung steigt. [256] Bezugnehmend auf die weitere Anwendbarkeit dieser Methode, bei der medizinisch relevante Moleküle anwesend sein können, welche nicht zerstört und außerdem aus den Endosomen freigesetzt werden sollten, ist eine gezielte Vorgehensweise erstrebenswert. Mögliche Anwendungen können beispielsweise der gezielte Medikamententransport oder die gezielte Pharmakotherapie (Kapitel 3.1) sein.

Ein externer Trigger wie die Laserbestrahlung kann die Endosomen öffnen, wodurch neben der örtlichen Spezifizierung auch der zeitliche Faktor bestimmt werden kann. Für die Vermeidung von Effekten, wie Vakuolen oder Blasenbildung, während der Laserbestrahlung der Zellen, sollte die Energie optimal eingestellt sein. Für dieses Experiment wurde während der Inkubation der Zellen mit den Agglomeraten zusätzlich der zellimpermeable Farbstoff Calcein hinzugegeben. Bei der Aufnahme der Agglomerate sind die Calcein-Moleküle ebenfalls in die Endosomen gelangt. Nach der Aufnahme sind fluoreszierende Punkte in den Zellen sichtbar, welche die Endosomen mit den Partikel-Agglomeraten und dem Calcein darstellen. (Abbildung 79 B)

Durch die Bestrahlung der Zellen wird die endosomale Membran rupturiert und der Inhalt diffundiert durch die gesamte Zelle, dies führt zu einem Anstieg in der Fluoreszenz des bestrahlten Bereiches. (Abbildung 79 C)

Der Fluoreszenzfarbstoff verteilt sich über das Zytoplasma, es ist zu erkennen, dass weiterhin einige hell fluoreszierende Punkte in der Zelle vorliegen. Dies deutet darauf hin, dass nicht der gesamte Inhalt aus den Endosomen freigesetzt wird. Der Grund hierfür ist, dass einerseits nicht alle Endosomen und andererseits die Endosomen nur teilweise geöffnet wurden. Dies kann umgangen werden, indem die Agglomerate in ihrer Größe und Form einheitlicher hergestellt werden, was beispielsweise durch die Verringerung der Verteilungsbreite erreicht werden kann. Eine weitere Möglichkeit ist die Inkubationsdauer zu verkürzen, sodass bei den Endosomen der gleiche Reifungsgrad vorliegt, wenn sie bestrahlt werden.

Das Bild der Hellfeld-Aufnahme zeigt nach der Bestrahlung keine Veränderung in der Zellmorphologie (Abbildung 79 D) im Vergleich zu der Aufnahme vor der Bestrahlung (Abbildung 79 A).

Für eine effektive Freisetzung der Substanzen, welche sich in den Endosomen befinden, ist die optimale Fluenz wichtig. Aus diesem Grund wurde eine Fluenzsuche durchgeführt. Es wurden verschiedene Fluenzen zwischen 0 mJ/cm² und 35 mJ/cm² unter dem Aspekt der effizienten Freisetzung des Fluoreszenzfarbstoffes Calcein untersucht. Bei der Ermittlung der relativen Anzahl an Zellen pro Bild (Abbildung 79 E), welche die intrazelluläre Molekülfreisetzung beschreibt, wurde die Menge der Zellen mit ausreichend fluoreszierender Änderung pro Bild gezählt.

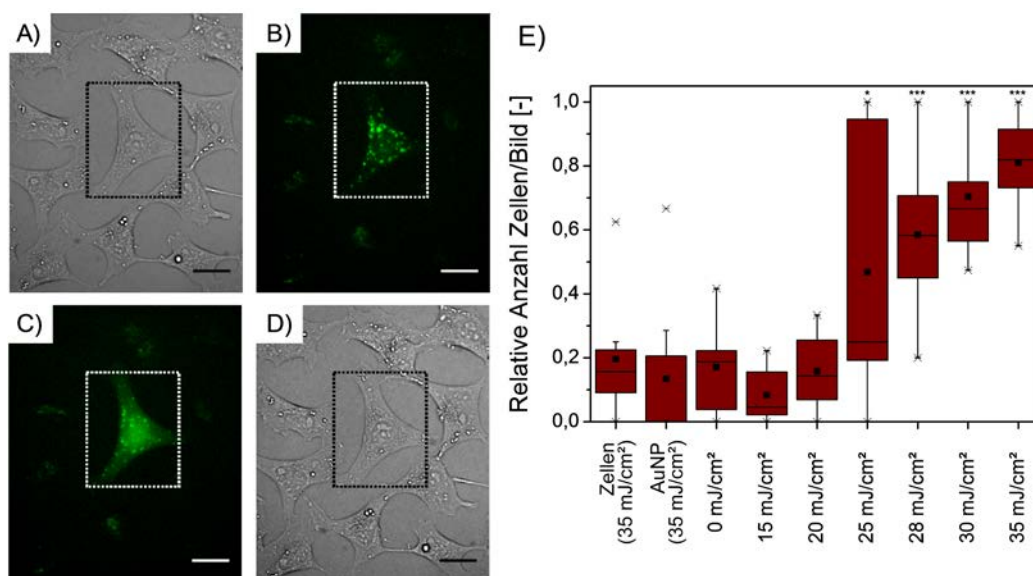


Abbildung 79: Aufnahmen von Hellfeld-Mikroskopie (A, D) und Fluoreszenzmikroskopie (B, C) von AuNP-CPP-Agglomeraten aufgenommen in ZMTH3-Zellen vor (A, B) und nach (C, D) der Laserbestrahlung. E) Darstellung der effizienten intrazellulären Freisetzung in Abhängigkeit verschiedener Bestrahlungsfluenzen. Die Kreuze stellen den maximalen und minimalen Wert des Datensatzes dar. Ein zweifacher T-Test weist auf einen signifikanten Anstieg ab 25 mJ/cm² hin. (** $p < 0.001$, * $p < 0.04$). Die Box enthält 25 - 75% der Datenwerte und die Linie stellt den Median des Datensatzes dar. Die Abbildung ist adaptiert nach Krawinkel et al. [223].⁵²

Die Kontrollen, bei denen keine Nanopartikel und nur die Primärpartikel bestrahlt wurden ebenso wie die Proben mit Agglomeraten, welche mit einer Fluenz bis zu 20 mJ/cm² bestrahlt wurden, zeigen keine signifikante Freisetzung des Calceins in das Zytoplasma. Die unerwarteten Werte von bis zu 20% bei den Kontrollen und der Probe ohne Bestrahlung können aufgrund eines Absetzens der Farbstoffmoleküle auf die Zellmembran und der darauffolgenden Aufnahme mittels natürlicher Endozytose erreicht werden. Bei einer Fluenz von 25 mJ/cm² variieren die Messwerte über den gesamten Bereich der y-Skala. Bei einer Fluenz von 28 mJ/cm² wurde das Calcein in 58% der Zellen effizient freigesetzt. Bei 35 mJ/cm² liegt die relative Anzahl an fluoreszierenden Zellen pro Bild bei 81%. In dem Bereich zwischen 28 mJ/cm² und 35 mJ/cm² konnte mittels zweifachem T-Test eine signifikante Änderung der Fluoreszenz ermittelt werden. Die Freisetzungseffizienz bei Fluenzen zwischen 20 mJ/cm² und 35 mJ/cm² folgt einem logarithmischen Anstieg, dies passt zu der Aufnahme von Farbstoffmolekülen mittels Optoinjektion. [257]

Höhere Fluenzen würden die Freisetzung nicht mehr signifikant verbessern und nur die Schädigung der bestrahlten Zellen erhöhen. Die Konjugation des freizusetzenden Moleküls an die Partikelagglomerate würde verhindern, dass diese Moleküle frei in der

⁵² Judith Krawinkel, Undine Richter, Maria Leilani Torres-Mapa, Martin Westermann, Lisa Gamrad, Christoph Rehbock, Stephan Barcikowski and Alexander Heisterkamp. Optical and electron microscopy study of laser-based intracellular molecule delivery using peptide-conjugated photodispersible gold nanoparticle agglomerates. *J. Nanobiotechnol.*, 14 (2):1 – 14, 2016. <http://dx.doi.org/10.1186/s12951-015-0155-8>. This figure is used under CC BY 4.0 / Adapted from original.

Lösung vorliegen und verbessert somit die Spezifität der Methode. Dieser Aspekt wurde einmalig beispielhaft anhand einer stark negativ geladenen Plasmid-DNA gezeigt. Die hierbei hergestellten Peptid-Konjugate wurden mit der DNA bifunktionalisiert und anschließend, nach Inkubation mit den Zellen, mit 35 mJ/cm² bestrahlt. Aufgrund eines Fluoreszenzsignals nach Freisetzung der DNA (Anhang: Abbildung 228) konnte die anwendungstechnische Relevanz der Studie bestätigt werden.

Ein wichtiger Aspekt bei der Arbeit mit biologischen Zellen ist die Viabilität nach der Behandlung. Es wurde die Viabilität der Zellen quantitativ mittels Propidiumiodid (PI) und Calcein AM ermittelt. Der Unterschied dieses Calcein-Derivats zu dem zuvor verwendeten Calcein liegt darin, dass es sich bei diesem Farbstoff um ein zellpermeables Molekül handelt. Das bedeutet, dass Calcein AM durch die Membran der Zellen tritt. In lebenden Zellen wird die Acetoxymethyl-Gruppe durch die Esterasen entfernt, wodurch das Calcein beginnt zu fluoreszieren. Tote Zellen sind von daher nicht sichtbar. Es konnte keine signifikante Beeinträchtigung der Zellen bei Fluenzen bis 35 mJ/cm² beobachtet werden. (Anhang: Abbildung 220 B) Hierbei ist anzumerken, dass diese Messung nicht für die Transfektion der Zellen mit Plasmid-DNA durchgeführt wurden.

Bei einer Bestrahlung mit der höchsten Fluenz wurde eine Lebendrate von 94% der Zellen gefunden, wohingegen 6% der Zellen PI-positiv waren. Die Langzeitviabilität bis zu 72 Stunden nach der Bestrahlung, welche anhand der metabolischen Aktivität mit Hilfe von PrestoBlue ermittelt wurde, weist keinen signifikanten Unterschied zur Kontrolle ohne Partikel und ohne Bestrahlung auf. (Anhang: Abbildung 220 A) Des Weiteren konnte bei den Zellen, welche mit den zwei verwendeten Peptiden NLS_{Cys} und CWR₁₀ behandelt wurden, keine Unterschiede in der metabolischen Aktivität gefunden werden. Aus diesem Grund sind die Ergebnisse der beiden Peptid-Sorten kombiniert worden. Für alle weiteren Experimente wurde die Laserfluenz von 35 mJ/cm² verwendet.

Desagglomerationseffekte der AuNP-CPP-Agglomerate innerhalb und außerhalb von Zellen

Wie bereits erwähnt, werden die Endosomen durch die Laserbestrahlung aufgebrochen und die Nanopartikel werden in das Zytoplasma freigesetzt. Das Aufbrechen der Endosomen erfolgt aufgrund der Wechselwirkung zwischen Laser und Nanopartikel-Agglomeraten. Hierbei stellt die Größe der Partikel einen wesentlichen Faktor dar. Durch die Konjugation der 5 nm großen Primärpartikel mit positiv geladenen Peptiden erfolgt eine Rotverschiebung und Verbreiterung des SPR-Peaks, dies wird durch geringere Interpartikelabstände und eine größere Menge an Agglomeraten verstärkt. [258, 259]

Die Position des SPR-Peaks bei etwa 532 nm bedingt die Verstärkung des Extinktions-Querschnitts und der Streu-, sowie der Absorptions-Effizienz. [259, 260] Aufgrund dieser Eigenschaften erfolgt ein Wärmeeintrag in die Partikel und es werden sogenannte „Hot Spots“ gebildet. Die bei der Bestrahlung eingesetzte Wellenlänge von 532 nm ist ideal, da der SPR-Peak bei 532 - 565 nm liegt (Anhang: Abbildung 214 B) und somit der Laserstrahl optimal in die Partikelagglomerate einkoppeln kann.

Der Effekt der Laserbestrahlung von Agglomeraten kann mittels UV-Vis-Spektroskopie verfolgt werden, weil eine Desagglomeration unmittelbar an der Position des SPR-Peaks zu erkennen ist. In Abbildung 80 A ist zu erkennen, dass sich nach der Bestrahlung von AuNP-NLS_{Cys}- und AuNP-CWR₁₀-Konjugaten die Farbe ändert. Das Kolloid scheint weniger violett und mehr rötlich zu sein, dies deutet bereits auf eine Desagglomeration der Partikel hin.

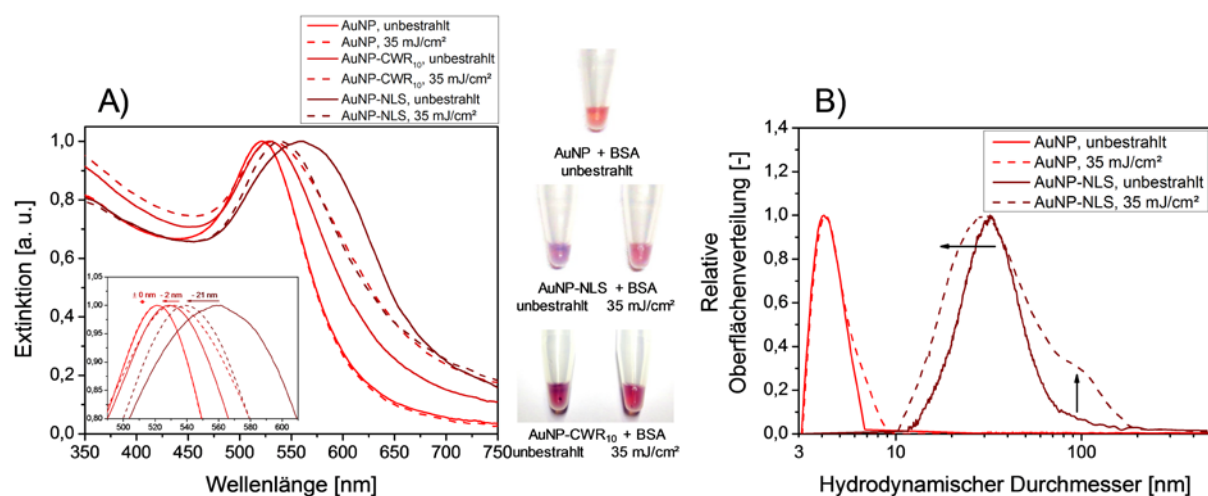


Abbildung 80: Effekt der Laserbestrahlung auf AuNP-CPP-Agglomerate. Darstellung der SPR-Peak-Verschiebung (A) und der Veränderung der Größenverteilung (B) vor und nach der Bestrahlung von AuNP-CPP-Agglomeraten mit 35 mJ/cm².

In dem UV-Vis-Spektrum ist eine Blauverschiebung des Peaks zu erkennen. Hierbei ist anzumerken, dass die Verschiebung bei den NLS_{Cys}-Konjugaten mit -21 nm ausgeprägter ist als bei den CWR₁₀-Konjugaten mit -2 nm. Dieser Unterschied kann darauf zurückgeführt werden, dass beide Agglomeratvarianten sich nach der Bestrahlung dem gleichen Zustand mit einem bestimmten Interpartikelabstand annähern. Folglich fällt aufgrund der zuvor stärkeren Rotverschiebung für NLS_{Cys} auch die Blauverschiebung stärker aus. Bei der Betrachtung der Oberflächenverteilung (Abbildung 80 B) ist zu erkennen, dass die Partikelgröße nach der Bestrahlung nicht nur zu geringeren Werten verschoben wird. Es ist zudem eine Erhöhung im Bereich um 100 nm zu erkennen, welche auf ein Zusammenschmelzen der Partikel hindeutet.

Die Desagglomeration der Partikel kann auch mittels TEM bestätigt werden. An der Stelle, an der zuvor die Partikel lagen, sind nur vereinzelte Nanopartikel und nicht elektronendichtes Material in der Form des Agglomerats vorzufinden. (Anhang: Abbildung 222 B)

Die Nanopartikel-Agglomerate, welche in die Zellen aufgenommen wurden, werden, wie bei der Bestrahlung der freien Agglomerate, separiert. Die meisten Endosomen, welche Nanopartikel enthielten, wurden aufgebrochen. Die Vergrößerung in Abbildung 81 B zeigt ein teilweise rupturiertes Endosom, aus dem die Partikel ins Zytoplasma der Zelle gelangen. Nach der Bestrahlung sind isolierte Partikel über das gesamte Zytoplasma verteilt, wobei sich die Mehrheit in der nahen Umgebung des Endosoms befindet, aus dem sie freigesetzt wurden. Diese Beobachtung widerspricht der Erwartung, dass die Primärpartikel die Kernhülle penetrieren können, weil dies bereits mit Partikeln ähnlicher Größe (< 9 nm) und größeren Partikeln (> 39 nm) gezeigt wurde. [261]

Eine mögliche Erklärung kann sein, dass die Zellen unmittelbar nach der Bestrahlung fixiert und eingebettet wurden, wodurch die Nanopartikel nicht weiter in das Zytoplasma diffundieren konnten. Des Weiteren kann es möglich sein, dass Exozytose aufgetreten ist [124, 253, 254] und hierdurch eine geringere Menge der Partikel in den Endosomen vorliegt.

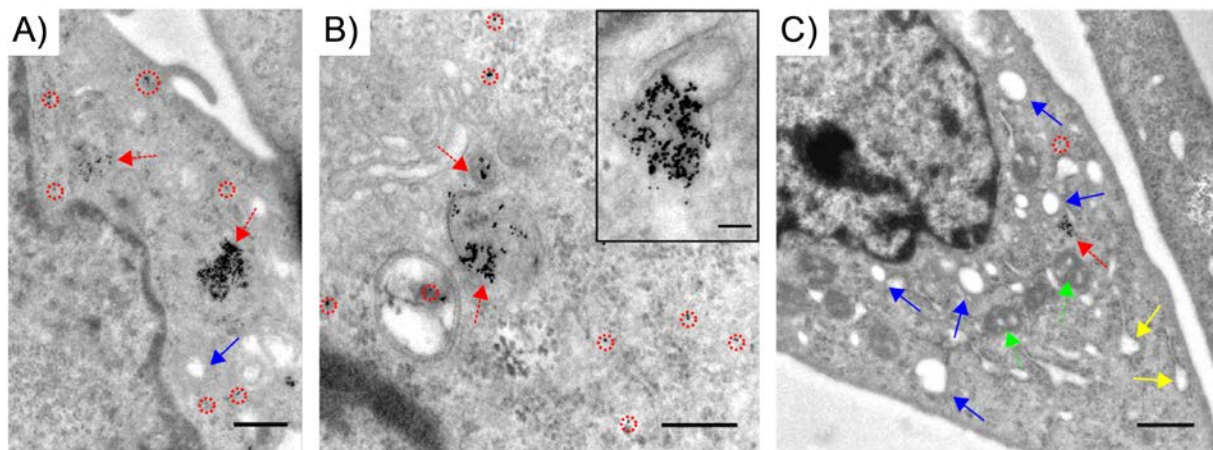


Abbildung 81: TEM-Aufnahmen von laserbestrahlten Zellen, welche AuNP-CPP-Konjugate mittels Endozytose aufgenommen haben. Die Zellen wurden mit 25 mJ/cm² (A) und 35 mJ/cm² (B, C) bestrahlt. Die roten gestrichelten Pfeile weisen auf aufgebrochene Endosomen hin und die Partikel, welche aus diesen Endosomen vereinzelt ins Zytoplasma gelangen konnten, wurden rot eingekreist. Blaue Pfeile weisen auf laser-induzierte Vakuolen hin. Vakuolen in Mitochondrien sind mit grünen Pfeilen gekennzeichnet und aufgesprengte Lumen des endoplasmatischen Retikulums mit gelben Pfeilen. Die eingezeichneten Maßbalken entsprechen 500 nm (A), 300 nm (B), 100 nm (Vergrößerung in B) und 800 nm. Die Abbildung ist adaptiert nach Krawinkel et al. [223].⁵³

Die Bestrahlung der Nanopartikel-Agglomerate erhöht die Wahrscheinlichkeit der Exozytose, weil kleinere Partikel schneller aus der Zelle gebracht werden können. [254] Durch diese Tatsache können Langzeit-Effekte reduziert werden, denn auch die Entfernung von Partikeln dieser Größe aus dem Körper ist verbessert. [262] Der Vergleich der bestrahlten Zellen mit 25 mJ/cm² und 35 mJ/cm² zeigt, dass bei der höheren Fluenz ein vermehrtes Auftreten von Vakuolen zu verzeichnen ist. (Abbildung 81 C) Dies kann möglicherweise von einem aufgeblähten Lumen des endoplasmatischen Retikulums kommen. Vakuolen können zytotoxisch sein, weil sie autophagischer Natur sind. [263]

In Verbindung mit den zuvor gezeigten guten Ergebnissen der Viabilität und der metabolischen Aktivität der Zellen nach der Bestrahlung, kann geschlussfolgert werden, dass die Zellen das Auftreten der Vakuolen bei der Bestrahlung mit Fluenzen bis zu 35 mJ/cm² regulieren können. Bei einer geringeren Fluenz von 25 mJ/cm² sind weniger dieser Vakuolen zu finden. Es ist außerdem ein geringer Anteil dieses Phänomens in nicht-bestrahlten Zellen zu finden.

⁵³ Judith Krawinkel, Undine Richter, Maria Leilani Torres-Mapa, Martin Westermann, Lisa Gamrad, Christoph Rehbock, Stephan Barcikowski and Alexander Heisterkamp. Optical and electron microscopy study of laser-based intracellular molecule delivery using peptide-conjugated photodispersible gold nanoparticle agglomerates. *J. Nanobiotechnol.*, 14 (2):1 – 14, 2016. <http://dx.doi.org/10.1186/s12951-015-0155-8>. This figure is used under CC BY 4.0 / Adapted from original.

Die Desagglomeration der Partikel und das Aufbrechen der Endosomen kann auf einen Wärmeeintrag in die Agglomerate zurückgeführt werden. Bei diesen Experimenten wurde ein Nanosekundenlaser verwendet, bei dem die Pulslänge 1 ns beträgt. Des Weiteren ist bekannt, dass für Partikel unter 80 nm die Absorption gegenüber der Streuung dominiert. [258]

Durch die Bestrahlung der Partikel erfolgt ein Wärmeeintrag in die Agglomerate, wodurch Elektronen beginnen zu vibrieren und die Nanopartikel schmelzen, verdampfen oder explodieren können. [264, 265, 266, 267] Berechnungen⁵⁴ haben ergeben, dass die Temperatur des Mediums zwischen den Partikeln während der Bestrahlung mit 25 mJ/cm² geringfügig über der Schmelztemperatur von 1063°C liegt. Diese Temperatur kann zu einer explosiven Verdampfung des Mediums um die Nanopartikel führen. Demnach kann neben einer thermischen Schädigung der Membran ebenfalls eine Schockwelle entstehen. [266, 267] Ferner können Wasser- oder Kavitationsblasen zwischen den Partikeln induziert werden. [268, 269] Aus diesen Prozessen kann eine Expansions- und Kollaps-Dynamik entstehen, welche die Partikel auseinandersprengt, die endosomale Membran aufbricht und Nanopartikel und Moleküle aus dem Endosom freisetzt. Des Weiteren kann durch diese Prozesse das Auftreten größerer Partikel von etwa 100 nm durch ein Zusammenschmelzen der Partikel erklärt werden. Die in den vorliegenden Experimenten gefundene Grenzfluenz von 25 mJ/cm² ist vergleichbar mit der in der Literatur beschriebenen Grenzfluenz zur Nanopartikelverdampfung von 28 mJ/cm². [265, 270]

Bei der Betrachtung der Wechselwirkungen zwischen einzelnen Pulsen, kann eine Aufsummierung des Wärmeeintrags mehrerer Pulse vernachlässigt werden, weil hierbei der Abstand zwischen zwei Pulsen 44,4 µs beträgt und der Wärmeeintrag innerhalb von Nanosekunden erfolgt. Es wurde gezeigt, dass 10 ns nach dem Laserpuls, die sekundären Blasen kollabieren und bereits nach 20 ns die Temperatur in dem System erneut nahe der Starttemperatur liegt. [271]

Aufgrund der Tatsache, dass in diesen Experimenten Agglomerate verwendet werden, hätte außerdem ein zweiter Puls nicht den gleichen Effekt wie der erste Puls. Die Partikel desagglomerieren und verteilen sich im Zytoplasma. Hierdurch kann die Laserenergie von den Primärpartikeln nicht so effektiv absorbiert werden, wie bei

⁵⁴ Diese Berechnungen wurden von Dipl. Phys. Judith Krawinkel (Institut für Angewandte Optik, Friedrich-Schiller-Universität Jena) durchgeführt.

größeren Partikeln oder Agglomeraten, ferner entsteht keine weitere Schädigung der Zelle.

Die Konjugation von Goldnanopartikeln um die 5 nm mit zellpenetrierenden Peptiden kann durch die Bildung der Agglomerate zu einem präzisen subzellulären *Targeting* bei gleichzeitigem Erhalt der Zellintegrität führen. Es konnte keine Schädigung der Zelle gefunden, welche durch die Laserbestrahlung induziert wurde. Mit dieser Methode ist es möglich, Moleküle zeitlich und örtlich gezielt freizusetzen und hierdurch eine langsame Penetration des Moleküls durch die endosomale Membran zu umgehen. Ferner kann eine mögliche Degradation der biologischen Liganden innerhalb der Endosomen im Laufe der Zellreifung verhindert werden. [272, 273]

In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass sich Goldnanopartikel-Agglomerate als Trägersystem für beispielsweise Medikamente eignen. Sie werden effizient in die Zellen aufgenommen und können hierbei auch andere Moleküle in die Zelle schleusen. Des Weiteren können sie ohne Farbstoff innerhalb der Zelle mittels Multiphotonen-Mikroskopie detektiert werden und gezielt bestrahlt werden. Durch die Eigenschaft des Agglomerats kann innerhalb der Endosomen die Laserenergie absorbiert werden, wodurch die Partikel desagglomerieren und die Endosomen aufgesprengt werden. Die Einzelpartikel absorbieren die Energie bei weiterer Bestrahlung nicht, sodass eine Schädigung der Zelle über das Öffnen der Endosomen hinaus ausgeschlossen werden kann. Mögliche Bereiche, in denen diese Methode eingesetzt werden kann, sind die laserbasierte Zell-Nekrose, die Bildgebung innerhalb von Geweben und als Trägersysteme in der Medizin.⁵⁵

⁵⁵ Weitere Ergebnisse sind ergänzend in Kapitel 7.8.13. im Anhang zu finden.

5. Zusammenfassung

Goldnanopartikel besitzen viele Eigenschaften, die besonders in Bezug auf den Einsatz in biologischen und medizinischen Anwendungsgebieten vorteilhaft sind. Hierzu zählen die gute Biokompatibilität, die einfache Funktionalisierbarkeit und die einzigartigen optischen Eigenschaften, welche beispielsweise in der Detektion genutzt werden können. Dementsprechend waren Goldnanopartikel bereits zu Beginn dieser Arbeit Bestandteil vieler Forschungsstudien.

Diese Studien basierten jedoch bislang noch zu einem Großteil auf Goldnanopartikel aus der chemischen Synthese. Diese Partikel sind oft einheitlich in ihrer Größe und ermöglichen den Einsatz von hohen Partikelkonzentrationen. Allerdings werden zur Herstellung der Partikel auch toxisch wirkende Substanzen als Reduktionsmittel und Stabilisator eingesetzt, welche nach der Synthese nur schwer abzutrennen sind. Daraus folgend können bei der Funktionalisierung dieser Partikel keine eindeutigen Schlussfolgerungen gezogen werden, da zum einen nicht eindeutig bestimmt werden kann, welcher Effekt aufgrund der *ex situ* gebundenen Liganden oder der Stabilisatormoleküle auftritt. Zum anderen können auch Kreuzeffekte und Wechselwirkungen der Funktionsliganden mit den Stabilisatorsubstanzen auftreten oder die Funktionalität wird eingeschränkt.

Eine gute Alternative bietet hierbei die vergleichsweise junge Methode der Laserablation in Flüssigkeiten, wo diese Arbeit ansetzt. Zu Beginn der vorliegenden Arbeit hat es bereits einige Arbeiten zur Funktionalisierung von ligandenfreien Goldnanopartikeln mit funktionalen Biomolekülen wie Peptide und Oligonukleotide gegeben. Hierbei wurde die Konjugation in einem einstufigen Prozess als *In-situ*-Konjugation oder in einem Durchflussreaktor als verzögerte Konjugation durchgeführt. Problematisch war hier vor allem die schlechte Größenkontrolle der Partikel und die Schwierigkeit die Oberflächenbedeckung der Partikel unabhängig von der Partikelgröße einstellen zu können.

Mit der vorliegenden Arbeit erfolgte erstmals basierend auf lasergenerierten Goldnanopartikeln die Herstellung und umfangreiche Analyse von verschiedenen Nanopartikel-Biokonjugaten zum Einsatz in biologischen Anwendungen. Hierbei ist eine systematische und multiparametrische Untersuchung zur Funktionalisierung von lasergenerierten Goldnanopartikeln durchgeführt worden, um schließlich das Wissen

über die Möglichkeiten bei der Biokonjugation mit verschiedenen Biomolekülen aufgrund der auftretenden Effekte zu erweitern. Diese Untersuchungen wurden in einem zweistufigen *Ex-situ*-Konjugationsverfahren durchgeführt, um die genannten Probleme des *In-situ*-Prozesses zu vermeiden. Im weiteren Verlauf der Arbeit wurden die Konjugate auf ihre Funktionalität sowie Kompatibilität für biologische Experimente untersucht worden. Schließlich ist die Einsatzfähigkeit der Goldnanopartikel-Biokonjugate an drei exemplarischen, anwendungsorientierten Zellexperimenten gezeigt worden. Mit diesen Erkenntnissen soll es in Zukunft möglich sein, Biokonjugate für den Einsatz in weiteren biomedizinischen Anwendungen spezifisch zu entwerfen.

Die Basis der zu synthetisierenden Biokonjugate stellen die Goldnanopartikel dar. Bei der Synthese der Nanopartikel stand der Durchmesser von weniger als 10 nm, eine monomodale Verteilung, eine hohe Reproduzierbarkeit sowie eine gute Stabilität gegen Agglomeration, auch in biologischen Medien, im Vordergrund. Dieses Ziel wurde erreicht, indem die Herstellung der Partikel durch gepulste Laserablation in Elektrolytlösungen erfolgte. Die Variation verschiedener wässriger Lösungsmittel (NaCl, NaPP, NaOH) hat ergeben, dass die Verwendung von 600 μ M Natriumphosphatpuffer für die Herstellung des Ausgangskolloids am besten geeignet ist. Die zweite Mode zwischen 10 und 100 nm, welche bei allen Varianten entstanden ist, konnte bei diesem Kolloid am effektivsten abgetrennt werden. Hierbei wurde die Ultrazentrifugation einem Fragmentierungsprozess vorgezogen. Die resultierenden monomodalen Goldnanopartikel haben eine Größe von $5,2 \pm 1,2$ nm und konnten etwa einen Monat bei 7°C stabil gelagert werden, weshalb sie für die folgenden Experimente optimal geeignet waren. (Kapitel 4.1)

Diese ligandenfreien Goldnanopartikel dienten für die folgenden Experimente als Plattform, auf der verschiedene Liganden gebunden wurden. Bei den Liganden wurden Salze, kleine Moleküle mit einem Molekulargewicht von etwa 200 Da, Oligonukleotide und Peptide verwendet. Die Liganden wurden einerseits separat auf den Partikeln gebunden, um die monofunktionalen Konjugate zu untersuchen. Andererseits wurden multifunktionale AuNP-Oligonukleotid-Peptid- und AuNP-Salz-Biomolekül-Konjugate hergestellt und analysiert.

Die *Ex-situ*-Konjugation von Goldnanopartikeln mit Salzen wie Natriumphosphatpuffer, Natriumchlorid und Trinatriumcitrat im mikromolaren bis millimolaren Konzentrationsbereich weist verschiedene Effekte auf kolloidale Systeme auf. Während die Verwendung von Trinatriumcitrat zu einer Verbesserung der Kolloideigenschaften führt und sich auch Natriumchlorid positiv auf die Stabilität der Nanopartikel auswirkt, ist bei NaPP keine Verbesserung zu erkennen. Bei dieser Spezies sind eine hohe Polarisierbarkeit und eine hohe Hydratisierung Parameter, die beachtet werden müssen. Wird eine pH-abhängige Substanz oder ein Puffersystem wie NaPP verwendet, muss die Veränderung der Ionenstärke berücksichtigt werden, um die elektrostatische Stabilität der Nanopartikel nicht zu beeinträchtigen. (Kapitel 4.2.1)

Die Anbindung von Biomolekülen auf AuNP-Salz-Konjugaten zur Herstellung von bifunktionalen Konjugaten zeigt, dass Natriumchlorid einen positiven Einfluss auf die Stabilität der Konjugate ausübt. Besonders bei der Peptidkonjugation kann mit Hilfe der Chlorid-Anionen der Ladungsausgleich verhindert werden und dadurch können stabilere AuNP-Peptid-Konjugate erhalten werden. So kann auch Natriumphosphatpuffer für eine geringe Verbesserung eingesetzt werden. Trinatriumcitrat hingegen hat den gegenteiligen Effekt und verstärkt den Ladungsausgleich, dies führt zu einer verstärkten Agglomeration der Partikel. Bei der Konjugation von negativen Liganden wie LNA und SAP hingegen erweist sich Trinatriumcitrat neben Natriumchlorid als wirksamer Stabilisator, wobei der Effekt weniger signifikant ist als bei positiv geladenen Liganden. (Kapitel 4.2.6)

Die Partikel-Konjugation mit kleinen Molekülen wie Liponsäure und Dihydroliponsäure hat gezeigt, dass die Anbindung über Disulfid-Gruppen eine beständige Stabilisierung der Konjugate zur Folge hat. Dithiol-Gruppen hingegen weisen die Ausbildung von Goldnanopartikel-Agglomeraten auf, welche erst bei eingesetzten Ligandendosen von größer 1000 Liganden/NP gegen äußere Einflüsse wie g-Kräfte stabil sind. Dieser Konzentrationsbereich liegt oberhalb der Oberflächensättigung der Partikel von 400 Liganden/NP. Bei diesen Experimenten wurden verschiedene Bindungsmechanismen der Moleküle mit Disulfid- und Dithiol-Gruppen vermutet, wobei die Unterschiede an dieser Stelle noch nicht eindeutig beschrieben werden können. (Kapitel 4.2.1)

Bei der Untersuchung von monofunktionalen AuNP-Peptid-Konjugaten wurde zum einen ermittelt, dass die Konjugation über eine Thiol-Bindung zu einer besseren Stabilität führt als über rein elektrostatische Wechselwirkungen. (Kapitel 4.2.2) Zum anderen wurden verschiedene Protokolle zur Aufreinigung von Biokonjugaten entwickelt. Zu diesen Methoden zählen die Gelelektrophorese, die Zentrifugalfiltration und die Ultrazentrifugation. Anhand der Ergebnisse weist die Ultrazentrifugation die höchste Effektivität zur Abtrennung ungebundener Liganden aus den Konjugaten auf. Für die Aufreinigung von beabsichtigt agglomeratbildenden Peptid-Konjugaten kann diese Methode jedoch zu einer irreversiblen Aggregation der Partikel führen, wodurch in diesem Fall der Einsatz der Zentrifugalfiltration vorzuziehen ist. (Kapitel 4.2.3)

Die Herstellung von AuNP-Oligonukleotid-Konjugaten basiert auf einem Salzalterungsprozess mit anschließender Inkubationszeit. Bezüglich dieser Aspekte wurde ermittelt, dass Natriumchlorid sich für die Abschirmung der Ladungen während der Salzalterung besser eignet als Natriumphosphatpuffer. Die Oberflächenbeladung ist hierbei höher. Die optimale Inkubationsdauer beträgt maximal 24 Stunden. Eine längere Inkubationsdauer hat keinen Einfluss auf die Oberflächenbeladung. Darüber hinaus wurde der Verlauf der Konjugation mit Oligonukleotiden in dem beschriebenen Konzentrationsbereich von bis zu 300 Liganden/AuNP durch eine Freundlich-Isotherme bestimmt. (Kapitel 4.2.4)

Der Vergleich zwischen DNA- und LNA-Sequenzen weist Unterschiede in der Oberflächenbelegung auf, welche auf die Starrheit der LNA und die Flexibilität der DNA zurückzuführen sind. Bei gleicher Sequenzlänge ist die Beladung an LNA um etwa 50% geringer als die Beladung an DNA. Dies liegt insbesondere daran, dass die DNA-Stränge flexibel sind und sich zusammenknäulen können. Dadurch sind möglicherweise auch negative Ladungen innerhalb der Struktur, wodurch die nach außen gerichteten Ladungen der DNA mit einer geringeren Menge an Gegenionen abgeschirmt werden können. Die LNA hingegen besitzt eine starre Struktur, wodurch alle Ladungen der Sequenz abgeschirmt werden müssen und für die gleiche Beladung mehr Salz verwendet werden muss. Die Stabilität hingegen ist bei AuNP-LNA- und AuNP-DNA-Konjugaten vergleichbar. Weiterhin wurde auch eine Abhängigkeit der Oberflächenbeladung von der Sequenzlänge für DNA und LNA bestätigt, welche jedoch für die LNA ausgeprägter ist. Die Stabilität der AuNP-LNA-Konjugate (Kapitel 4.3.2.1) ist sehr gut und konnte in biologischen Puffern, wie TRIS-Puffer und PBS-Puffer, verifiziert werden. Selbst in PBS mit 10 mM $MgCl_2$ konnte eine kurzzeitliche

Stabilität von weniger als einem Tag ermittelt werden. Neben einer Temperaturstabilität bis 80°C wurde die Funktionsfähigkeit der gebundenen LNA-Sequenzen gezeigt. Dies erfolgte anhand einer Hybridisierung an synthetische doppelsträngige DNA. (Kapitel 4.3.2.2)

Die bifunktionale Konjugation mit Oligonukleotiden und Peptiden (Kapitel 4.2.5) hat gezeigt, dass ein Verhältnis von bis zu vier Peptidliganden pro LNA- oder DNA-Ligand auf den Goldnanopartikeln gebunden werden kann. Die Gesamtmenge der Oberflächenliganden lag jedoch unterhalb der Sättigungsbeladung. Dies führt zu dem Schluss, dass neben diesen beiden Ligandentypen noch Platz für andere Spezies ist. Durch die Verwendung von Liganden mit unterschiedlichen Ladungen können stabile Konjugate, welche positiv geladene Bereiche auf der Oberfläche haben, erhalten werden. Dies ist insbesondere in biologischen Experimenten bezüglich der Wechselwirkung mit der negativ geladenen Zellmembran von Vorteil.

Aus den erhaltenen Erkenntnissen wurde schließlich ein Bewertungssystem entworfen, anhand dessen die notwendigen Eigenschaften eines Biokonjugats für biomedizinische Anwendungen festgelegt werden können. Aus der Kombination der verschiedenen Eigenschaften kann dann das entsprechende Biokonjugat spezifisch für Anwendungen entworfen und hergestellt werden. (Kapitel 4.3)

Anhand der biologischen Experimente, welche in Kooperation mit den Mitarbeitern des Friedrich-Löffler-Instituts, des Universitätsklinikum Essen und der Friedrich-Schiller-Universität Jena durchgeführt wurden, konnte gezeigt werden, dass die hergestellten monofunktionalen und bifunktionalen Konjugate für den Einsatz in medizinisch relevanten Anwendungen geeignet sind. Die Verwendung von AuNP-LNA und AuNP-LNA-NLS_{Cys} war teilweise erfolgreich bei der Penetration von Bullenspermien und der Hybridisierung von genomischer DNA in freier und kondensierter Form (demembraniserte Spermienköpfe). Es wurde eine spezifische Anordnung der Konjugate an den Spermien abhängig der Membrankompartimente ermittelt. So erfolgt beispielsweise eine besonders ausgeprägte Anlagerung an dem Äquatoralsegment und dem Geißelansatz der Spermien. Die Hybridisierung an biologischen Proben funktioniert, ist jedoch fehlerbehaftet. Dies erfordert weitere Experimente zur Verbesserung der Reproduzierbarkeit. (Kapitel 4.3.3)

Auch bei der Penetration und Transfektion von regulatorischen T-Zellen erfolgte der Einsatz von AuNP-LNA-NLS_{Cys}-Konjugaten. Die Konjugate wurden über Endozytose aufgenommen und verblieben in den Endosomen der Zelle. Eine spezifische siRNA, welche als drittes Funktionsmolekül elektrostatisch auf dem Konjugat gebunden wurde, konnte aus dem Endosom in das Zytoplasma der Zelle gelangen und dadurch die eGFP-Expression verringern. (Kapitel 4.3.4)

Monofunktionale AuNP-Konjugate, welche als Agglomerate vorliegen, wurden für den Einsatz in karzinogenen ZMTH3-Zellen verwendet. Die Agglomerate wurden effektiv aufgenommen und konnten anschließend zeitlich und örtlich steuerbar mittels Laserbestrahlung freigesetzt werden. Dies erfolgte aufgrund der Energieabsorption durch die Agglomerate, welche dispergiert wurden und dadurch die Endosomen zerstörten. Die Einzelpartikel, ebenso wie koinkubierte Moleküle, wurden somit in das Zytoplasma der Zelle freigesetzt. Dies stellt eine erstmalige Demonstration des Prinzips der intrazellulären Photodispersion dar, welche erst durch das Design der AuNP-Biokonjugate ermöglicht wurde. (Kapitel 4.3.5)

Diese Arbeit stellt eine systematische Analyse der gesamten experimentellen Abläufe zur Herstellung gezielter mono- und multifunktionalisierter Goldnanopartikel-Biokonjugate dar, einschließlich der Syntheseparameter und der notwendigen Aufreinigungsmethoden bis zur Anwendbarkeit in biologischen Experimenten.

Aus den Resultaten zur Biofunktionalisierung der ligandenfreien Goldnanopartikel konnten Schlussfolgerungen gezogen werden, welche die Herstellung spezifisch wirkender Goldnanopartikel-Biokonjugate für den Einsatz in unterschiedliche Anwendungen ermöglicht. Das Verständnis über die Einflussnahme von Liganden, weiteren Substanzen sowie Versuchsbedingungen zur Entwicklung individueller Biokonjugate soll in Zukunft a priori genutzt werden können.

Die erfolgreiche Anwendbarkeit dieser systematischen Analyse konnte bereits bei der Entwicklung von funktionalen und spezifisch wirkenden Konstrukten gezeigt werden. Dementsprechend wurden für den Einsatz mit Bullenspermien anionische, genom-spezifisch-hybridisierende Einzelpartikelkonjugate synthetisiert. Für die Transfektion in regulatorische T-Zellen kamen Oligonukleotid-stabilisierte Einzelpartikel-Peptidkonjugate zum Einsatz und für die laserinduzierte Photodispersion in Krebszellen wurden Peptid-Konjugat-Agglomerate entwickelt.

6. Literaturverzeichnis

- [1] Robert R. Brooks. *Noble Metals and Biological Systems: Their Role in Medicine, Mineral Exploration, and the Environment*. CRC Press, Inc., 2000.
- [2] Hu Liu, ClinicalTrials.gov - A service of the U.S. National Institutes of Health; Diagnosis of Gastric Lesions With Na-nose; <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/record/NCT01420588?term=%22gold+nano%22&rank=3>; aufgerufen am 13.04.2016.
- [3] Alexander Kharlamov, Jan Gabinsky und Olga Kovtun, ClinicalTrials.gov - A service of the U.S. National Institutes of Health; Plasmonic Photothermal and Stem Cell Therapy of Atherosclerosis Versus Stenting (NANOM PCI); <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01436123?term=%22gold+nano%22&rank=1>; aufgerufen am 13.04.2016.
- [4] Jan Gabinsky, Olga Kovtun und Alexander Kharlamov, ClinicalTrials.gov - A service of the U.S. National Institutes of Health; Plasmonic Nanophotothermic Therapy of Atherosclerosis (NANOM-FIM); https://clinicaltrials.gov/ct2/show/record/NCT01270139?term=gold+nano &rank=1&show_desc=Y; aufgerufen am 13.04.2016.
- [5] Web of Science, Thomson Reuters; <https://apps.webofknowledge.com/>, aufgerufen am 17.05.2016.
- [6] Erik C. Dreaden, Alaaldin M. Alkilany, Xiaohua Huang, Catherine J. Murphy und Mostafa A. El-Sayed. The golden age: gold nanoparticles for biomedicine. *Chem. Soc. Rev.*, 41(7):2740 – 2779, 2012.
- [7] Ulrike Taylor, Wiebke Garrels, Annette Barchanski, Svea Peterson, Laszlo Sajti, Andrea Lucas-Hahn, Lisa Gamrad, Ulrich Baulain, Sabine Klein, Wilfried A. Kues, Stephan Barcikowski und Detlef Rath. Injection of ligand-free gold and silver nanoparticles into murine embryos does not impact pre-implantation development. *Beilstein J. Nanotechnol.*, 5:677 – 688, 2014.
- [8] Daniela Tiedemann, Ulrike Taylor, Christoph Rehbock, Jurij Jakobi, Sabine Klein, Wilfried A. Kues, Stephan Barcikowski und Detlef Rath. Reprotoxicity of gold, silver, and gold-silver alloy nanoparticles on mammalian gametes. *Analyst*, 139:931 – 942, 2014.

- [9] Ulrike Taylor, Daniela Tiedemann, Christoph Rehbock, Wilfried A. Kues, Stephan Barcikowski und Detlef Rath. Influence of gold, silver and gold-silver alloy nanoparticles on germ cell function and embryo development. *Beilstein J. Nanotechnol.*, 6(6):651 – 664, 2015.
- [10] Annette Barchanski, Csaba Laszlo Sajti, Camilla Sehring, Svea Petersen und Stephan Barcikowski. Design of bi-functional bioconjugated gold nanoparticles by pulsed laser ablation with minimized degradation. *J. Laser Micro/Nanoeng.*, 6(2):124 – 130, 2011.
- [11] David A. Giljohann, Dwight S. Seferos, Weston L. Daniel, Matthew D. Massich, Pinal C. Patel und Chad A. Mirkin. Gold nanoparticles for biology and medicine. *Angew. Chem., Int. Ed.*, 49(19):3280 – 3294, 2010.
- [12] Narani Anand, Pochamoni Ramudu, Kannapu Hari Prasad Reddy, Kamaraju Seetha Rama Rao, Bharatam Jagadeesh, Vemulapalli Sahithya Phani Babu und David Raju Burri. Gold nanoparticles immobilized on lipoic acid functionalized sba-15: Synthesis, characterization and catalytic applications. *Appl. Catal. A*, 454:119 – 126, 2013.
- [13] Li Shang, Naghmeh Azadfar, Florian Stockmar, Winfried Send, Vanessa Trouillet, Michael Bruns, Dagmar Gerthsen und G. Ulrich Nienhaus. One-pot synthesis of near-infrared fluorescent gold clusters for cellular fluorescence lifetime imaging. *Small*, 7(18):2614 – 2620, 2011.
- [14] Ryota Ueno und Hiroshi Yao. On the surface structure of 1,3-dithiol-protected gold nanoparticles interpreted by the size effect of ir absorption properties. *Colloids Surf. A*, 426:39 – 46, 2013.
- [15] Svea Petersen und Stephan Barcikowski. Conjugation efficiency of laser-based bioconjugation of gold nanoparticles with nucleic acids. *J. Phys. Chem. C*, 113(46):19830 – 19835, 2009.
- [16] Sarah J. Hurst, Abigail K. R. Lytton-Jean und Chad A. Mirkin. Maximizing dna loading on a range of gold nanoparticle sizes. *Anal. Chem.*, 78(24):8313 – 8318, 2006.
- [17] Svea Petersen, Anette Barchanski, Ulrike Taylor, Sabine Klein, Detlef Rath und Stephan Barcikowski. Penetratin-conjugated gold nanoparticles - design of cell-penetrating nanomarkers by femtosecond laser ablation. *J. Phys. Chem. C*, 115(12):5152 – 5159, 2010.

- [18] Csaba László Sajti, Annette Barchanski, Philipp Wagener, Sabine Klein und Stephan Barcikowski. Delay time and concentration effects during bioconjugation of nanosecond laser-generated nanoparticles in a liquid flow. *J. Phys. Chem. C*, 115(12):5094 – 5101, 2011.
- [19] Brendan D. Smith, Neeshma Dave, Po-Jung Jimmy Huang und Juewen Liu. Assembly of dna-functionalized gold nanoparticles with gaps and overhangs in linker dna. *J. Phys. Chem. C*, 115(16):7851 – 7857, 2011.
- [20] Chad A. Mirkin, Robert L. Letsinger, Robert C. Mucic und James J. Storhoff. A dna-based method for rationally assembling nanoparticles into macroscopic materials. *Nature*, 382(6592):607 – 609, 1996.
- [21] T. Andrew Taton, Chad A. Mirkin und Robert L. Letsinger. Scanometric dna array detection with nanoparticle probes. *Science*, 289(5485):1757 – 1760, 2000.
- [22] Zeljka Krpetic, Ishwar Singh, Wu Su, Luca Guerrini, Karen Faulds, Glenn A. Burley und Duncan Graham. Directed assembly of dna-functionalized gold nanoparticles using pyrrole-imidazole polyamides. *J. Am. Chem. Soc.*, 134(20):8356 – 8359, 2012.
- [23] Sarit S. Agasti, Apiwat Chompoosor, Chang-Cheng You, Partha Ghosh, Chae Kyu Kim und Vincent M. Rotello. Photoregulated release of caged anticancer drugs from gold nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.*, 131(16):5728 – 5729, 2009.
- [24] Xiaohua Huang, Xianghong Peng, Yiqing Wang, Yuxiang Wang, Dong M. Shin, Mostafa A. El-Sayed und Shuming Nie. A reexamination of active and passive tumor targeting by using rod-shaped gold nanocrystals and covalently conjugated peptide ligands. *ACS Nano*, 4(10):5887 – 5896, 2010.
- [25] Wei Lu, Chiyi Xiong, Guodong Zhang, Qian Huang, Rui Zhang, Jin Z. Zhang und Chun Li. Targeted photothermal ablation of murine melanomas with melanocyte-stimulating hormone analog–conjugated hollow gold nanospheres. *Clin. Cancer Res.*, 15(3):876 – 886, 2009.
- [26] Xuan Yang, Miaoxin Yang, Bo Pang, Madeline Vara und Younan Xia. Gold nanomaterials at work in biomedicine. *Chem. Rev.*, 115(19):10410 – 10488, 2015.
- [27] Chiara Uboldi, Daniele Bonacchi, Giada Lorenzi, M. Iris Hermanns, Christine Pohl, Giovanni Baldi, Ronald E. Unger und C. James Kirkpatrick. Gold nanoparticles

induce cytotoxicity in the alveolar type-ii cell lines a549 and ncih441. *Part. Fibre Toxicol.*, 6(1):1 – 12, 2009.

[28] Vincenzo Amendola und Moreno Meneghetti. Controlled size manipulation of free gold nanoparticles by laser irradiation and their facile bioconjugation. *J. Mater. Chem.*, 17(44):4705 – 4710, 2007.

[29] Svea Petersen und Stephan Barcikowski. In situ bioconjugation: Single step approach to tailored nanoparticle-bioconjugates by ultrashort pulsed laser ablation. *Adv. Funct. Mater.*, 19(8):1167 – 1172, 2009.

[30] Svea Petersen, Jurij Jakobi, Angelika Hoertinger und Stephan Barcikowski. In-situ conjugation - tailored nanoparticle-conjugates by laser ablation in liquids. *J. Laser Micro/Nanoeng.*, 4(1):71 – 74, 2009.

[31] Svea Petersen, Jurij Jakobi und Stephan Barcikowski. In situ bioconjugation - novel laser based approach to pure nanoparticle-conjugates. *Appl. Surf. Sci.*, 255(10):5435 – 5438, 2009.

[32] Csaba László Sajti, Svea Petersen, Ana Menéndez-Manjón und Stephan Barcikowski. In-situ bioconjugation in stationary media and in liquid flow by femtosecond laser ablation. *Appl. Phys. A: Mater. Sci. Process.*, 101(2):259 – 264, 2010.

[33] Anette Barchanski, Naomi Hashimoto, Svea Petersen, Csaba László Sajti und Stephan Barcikowski. Impact of spacer and strand length on oligonucleotide conjugation to the surface of ligand-free laser-generated gold nanoparticles. *Bioconjugate Chem.*, 23(5):908 – 915, 2012.

[34] Svea Petersen, Jan T. Soller, Siegfried Wagner, Andreas Richter, Jörn Bullerdiek, Ingo Nolte, Stephan Barcikowski und Hugo Murua Escobar. Co-transfection of plasmid dna and laser-generated gold nanoparticles does not disturb the bioactivity of gfp-hmgb1 fusion protein. *J. Nanobiotechnol.*, 7(1):1 – 6, 2009.

[35] María Carolina Durán, Saskia Willenbrock, Annette Barchanski, Jessika-M. V. Müller, Arianna Maiolini, Jan T. Soller, Stephan Barcikowski, Ingo Nolte, Karsten Feige, und Hugo Murua Escobar. Comparison of nanoparticle-mediated transfection methods for dna expression plasmids: efficiency and cytotoxicity. *J. Nanobiotechnol.*, 9(1):1 – 11, 2011.

- [36] Stefano Salmaso, Paolo Caliceti, Vincenzo Amendola, Moreno Meneghetti, Johannes Pall Magnusson, George Pasparakis und Cameron Alexander. Cell up-take control of gold nanoparticles functionalized with a thermoresponsive polymer. *J. Mater. Chem.*, 19:1608 – 1615, 2009.
- [37] Ulrike Taylor, Sabine Klein, Svea Petersen, Wilfried Kues, Stephan Barcikowski und Detlef Rath. Nonendosomal cellular uptake of ligand-free, positively charged nanoparticles. *Cytometry, Part A*, 77A:439 – 446, 2010.
- [38] Sabine Klein, Svea Petersen, Ulrike Taylor, Detlef Rath und Stephan Barcikowski. Quantitative visualization of colloidal and intracellular gold nanoparticles by confocal microscopy. *J. Biomed. Opt.*, 15(3):036015: 1 – 11, 2010.
- [39] Anette Barchanski, Ulrike Taylor, Sabine Klein, Svea Petersen, Detlef Rath und Stephan Barcikowski. Golden perspective: Application of laser-generated gold nanoparticle conjugates in reproductive biology. *Reprod. Domest. Anim.*, 46:42 – 52, 2011.
- [40] Bundesministerium für Bildung und Forschung, Bundesministerium für Bildung und Forschung; nano.DE-Report 2013 2013.
- [41] Yucai Wang, Yi Wang, Fengbo Zhou, Paul Kim und Younan Xia. Protein-protected au clusters as a new class of nanoscale biosensor for label-free fluorescence detection of proteases. *Small*, 8(24):3769 – 3773, 2012.
- [42] Xiaodong Zhang, Fu-Gen Wu, Peidang Liu, Ning Gu und Zhan Chen. Enhanced fluorescence of gold nanoclusters composed of hauc14 and histidine by glutathione: Glutathione detection and selective cancer cell imaging. *Small*, 10(24):5170 – 5177, 2014.
- [43] Robert A. Reynolds, Chad A. Mirkin und Robert L. Letsinger. Homogeneous, nanoparticle-based quantitative colorimetric detection of oligonucleotides. *J. Am. Chem. Soc.*, 122(15):3795 – 3796, 2000.
- [44] Robert Elghanian, James J. Storhoff, Robert C. Mucic, Robert L. Letsinger und Chad A. Mirkin. Selective colorimetric detection of polynucleotides based on the distance-dependent optical properties of gold nanoparticles. *Science*, 277(5329):1078 – 1081, 1997.
- [45] David E. Charlton und Neal W. Miller. Test device and method for colored particle immunoassay, November 23 1999.

- [46] Carlos Diaz-Vazquez, María José Torregrosa-Bertet, Ignacio Carvajal-Urueña, Alfredo Cano-Garcinuño, Emili Fos-Escrivà, Amparo García-Gallego, Ferrán López-Cacho, M^a Carmen Monzón-Fueyo, Xavier M. Pérez-Porcuna und M^a Luisa Ridaio-Redondo. Accuracy of immunocap rapid in the diagnosis of allergic sensitization in children between 1 and 14 years with recurrent wheezing: The irene study. *Pediatr. Allergy Immunol.*, 20(6):601 – 609, 2009.
- [47] Juan Yguerabide und Evangelina E. Yguerabide. Light-scattering submicroscopic particles as highly fluorescent analogs and their use as tracer labels in clinical and biological applications: I. theory. *Anal. Biochem.*, 262(2):137 – 156, 1998.
- [48] Juan Yguerabide und Evangelina E. Yguerabide. Light-scattering submicroscopic particles as highly fluorescent analogs and their use as tracer labels in clinical and biological applications: II. experimental characterization. *Anal. Biochem.*, 262(2):157 – 176, 1998.
- [49] Prashant K. Jain, Kyeong Seok Lee, Ivan H. El-Sayed und Mostafa A. El-Sayed. Calculated absorption and scattering properties of gold nanoparticles of different size, shape, and composition: Applications in biological imaging and biomedicine. *J. Phys. Chem. B*, 110(14):7238 – 7248, 2006.
- [50] Konstantin Sokolov, Michele Follen, Jesse Aaron, Ina Pavlova, Anais Malpica, Reuben Lotan und Rebecca Richards-Kortum. Real-time vital optical imaging of precancer using anti-epidermal growth factor receptor antibodies conjugated to gold nanoparticles. *Cancer Res.*, 63(9):1999 – 2004, 2003.
- [51] Chae Kyu Kim, Partha Ghosh, Chiara Pagliuca, Zheng-Jiang Zhu, Stefano Menichetti und Vincent M. Rotello. Entrapment of hydrophobic drugs in nanoparticle monolayers with efficient release into cancer cells. *J. Am. Chem. Soc.*, 131(4):1360 – 1361, 2009.
- [52] Erik C. Dreaden, Sandra C. Mwakwari, Quaovi H. Sodji, Adegboyega K. Oyelere und Mostafa A. El-Sayed. Tamoxifen - poly(ethylene glycol)-thiol gold nanoparticle conjugates: Enhanced potency and selective delivery for breast cancer treatment. *Bioconjugate Chem.*, 20(12):2247 – 2253, 2009.

- [53] Erik C. Dreaden, Megan A. Mackey, Xiaohua Huang, Bin Kang und Mostafa A. El-Sayed. Beating cancer in multiple ways using nanogold. *Chem. Soc. Rev.*, 40:3391 – 3404, 2011.
- [54] Bernhard Neuhaus, Benjamin Tosun, Olga Rotan, Annika Frede, Astrid M. Westendorf und Matthias Epple. Nanoparticles as transfection agents: a comprehensive study with ten different cell lines. *RSC Adv.*, 6:18102 – 18112, 2016.
- [55] Won Ho Kong, Ki Hyun Bae, Sung Duk Jo, Jee Seon Kim und Tae Gwan Park. Cationic lipid-coated gold nanoparticles as efficient and non-cytotoxic intracellular sirna delivery vehicles. *Pharm. Res.*, 29(2):362 – 374, 2012.
- [56] Shutao Guo, Yuanyu Huang, Qiao Jiang, Yun Sun, Liandong Deng, Zicai Liang, Quan Du, Jinfeng Xing, Yuliang Zhao, Paul C. Wang, Anjie Dong und Xing-Jie Liang. Enhanced gene delivery and sirna silencing by gold nanoparticles coated with charge-reversal polyelectrolyte. *ACS Nano*, 4(9):5505 – 5511, 2010.
- [57] Liang Cheng, Chao Wang, Liangzhu Feng, Kai Yang und Zhuang Liu. Functional nanomaterials for phototherapies of cancer. *Chem. Rev.*, 114(21):10869 – 10939, 2014.
- [58] Aravind Kumar Rengan, Amirali B. Bukhari, Arpan Pradhan, Renu Malhotra, Rinti Banerjee, Rohit Srivastava und Abhijit De. In vivo analysis of biodegradable liposome gold nanoparticles as efficient agents for photothermal therapy of cancer. *Nano Letters*, 15(2):842 – 848, 2015.
- [59] D. Patrick O’Neal, Leon R. Hirsch, Naomi J. Halas, J. Donald Payne und Jennifer L. West. Photo-thermal tumor ablation in mice using near infrared-absorbing nanoparticles. *Cancer Lett.*, 209(2):171 – 176, 2004.
- [60] Amtsblatt der europäischen union; empfehlung der kommission zur definition von nanomaterialien, Amtsblatt der Europäischen Union; Empfehlung der Kommission vom 18 Oktober 2011 zur Definition von Nanomaterialien 2011.
- [61] Stephan Barcikowski und Giuseppe Compagnini. Advanced nanoparticle generation and excitation by lasers in liquids. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 15(9):3022 – 3026, 2013.
- [62] Gustav Mie. Beiträge zur optik trüber medien, speziell kolloidaler metallösungen. *Ann. Phys.*, 330(3):377 – 445, 1908.

- [63] Sujit Kumar Ghosh und Tarasankar Pal. Interparticle coupling effect on the surface plasmon resonance of gold nanoparticles: From theory to applications. *Chem. Rev.*, 107(11):4797 – 4862, 2007.
- [64] Roland Barth. *Lexikon der Optik*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 1999.
- [65] Katherine A. Willets und Richard P. Van Duyne. Localized surface plasmon resonance spectroscopy and sensing. *Annu. Rev. Phys. Chem.*, 58(1):267 – 297, 2007.
- [66] Peter N. Njoki, I-Im S. Lim, Derrick Mott, Hye-Young Park, Bilal Khan, Suprav Mishra, Ravishanker Sujakumar, Jin Luo und Chuan-Jian Zhong. Size correlation of optical and spectroscopic properties for gold nanoparticles. *J. Phys. Chem. C*, 111(40):14664 – 14669, 2007.
- [67] K.-H. Su, Q.-H. Wei, X. Zhang, J. J. Mock, D. R. Smith und S. Schultz. Interparticle coupling effects on plasmon resonances of nanogold particles. *Nano Lett.*, 3(8):1087 – 1090, 2003.
- [68] Xiaohua Huang, Ivan H. El-Sayed, Wei Qian und Mostafa A. El-Sayed. Cancer cell imaging and photothermal therapy in the near-infrared region by using gold nanorods. *J. Am. Chem. Soc.*, 128(6):2115 – 2120, 2006.
- [69] Sujit Kumar Ghosh, Sudip Nath, Subrata Kundu, Kunio Esumi und Tarasankar Pal. Solvent and ligand effects on the localized surface plasmon resonance (lspr) of gold colloids. *J. Phys. Chem. B*, 108(37):13963 – 13971, 2004.
- [70] G. Dharanivasan, S. U. Mohammed Riyaz, D. Michael Immanuel Jesse, T. Raja Muthuramalingam, G. Rajendran und K. Kathiravan. Dna templated self-assembly of gold nanoparticle clusters in the colorimetric detection of plant viral dna using a gold nanoparticle conjugated bifunctional oligonucleotide probe. *RSC Adv.*, 6:11773 – 11785, 2016.
- [71] Chinnasamy Thiruppathiraja, Senthilkumar Kamatchiammal, Periyakaruppan Adaikkappan, Devakirubakaran Jayakar Santhosh und Muthukaruppan Alagar. Specific detection of mycobacterium sp. genomic DNA using dual labeled gold nanoparticle based electrochemical biosensor. *Anal. Biochem.*, 417(1):73 – 79, 2011.
- [72] Lisa Gamrad, Christoph Rehbock, Judith Krawinkel, Bayaraah Tumursukh, Alexander Heisterkamp und Stephan Barcikowski. Charge balancing of model gold-

nanoparticle-peptide conjugates controlled by the peptide's net charge and the ligand to nanoparticle ratio. *J. Phys. Chem. C*, 118(19):10302 – 10313, 2014.

[73] Christoph Rehbock, Vivian Merk, Lisa Gamrad, René Streubel und Stephan Barcikowski. Size control of laser-fabricated surfactant-free gold nanoparticles with highly diluted electrolytes and their subsequent bioconjugation. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 15(9):3057–3067, 2013.

[74] Younan Xia, Yujie Xiong, Byungkwon Lim und Sara E. Skrabalak. Formkontrolle bei der synthese von metallnanokristallen: einfache chemie, komplexe physik? *Angew. Chem.*, 121(1):62 – 108, 2009.

[75] Han Jia, Xinpei Gao, Zhaolong Chen, Guoqiang Liu, Xiao Zhang, Hui Yan, Hongtao Zhou und Liqiang Zheng. The high yield synthesis and characterization of gold nanoparticles with superior stability and their catalytic activity. *Cryst. Eng. Comm.*, 14:7600 – 7606, 2012.

[76] Nikhil R. Jana, Latha Gearheart und Catherine J. Murphy. Seeding growth for size control of 5-40 nm diameter gold nanoparticles. *Langmuir*, 17(22):6782 – 6786, 2001.

[77] Suresh K. Balasubramanian, Liming Yang, Lin-Yue L. Yung, Choon-Nam Ong, Wei-Yi Ong und Liya E. Yu. Characterization, purification, and stability of gold nanoparticles. *Biomaterials*, 31(34):9023 – 9030, 2010.

[78] Vincenzo Amendola und Moreno Meneghetti. What controls the composition and the structure of nanomaterials generated by laser ablation in liquid solution? *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 15(9):3027 – 3046, 2013.

[79] Patrick Lorazo, Laurent J. Lewis und Michel Meunier. Thermodynamic pathways to melting, ablation, and solidification in absorbing solids under pulsed laser irradiation. *Phys. Rev. B*, 73:134108: 1 – 22, Apr 2006.

[80] Philipp Wagener, Shyjumon Ibrahimkutty, Andreas Menzel, Anton Plech und Stephan Barcikowski. Dynamics of silver nanoparticle formation and agglomeration inside the cavitation bubble after pulsed laser ablation in liquid. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 15:3068 – 3074, 2013.

[81] Shyjumon Ibrahimkutty, Philipp Wagener, Andreas Menzel, Anton Plech und Stephan Barcikowski. Nanoparticle formation in a cavitation bubble after pulsed laser

ablation in liquid studied with high time resolution small angle x-ray scattering. *Appl. Phys. Lett.*, 101(10):103104: 1 – 4, 2012.

[82] Hitomi Muto, Kunihiro Yamada, Ken Miyajima und Fumitaka Mafuné. Estimation of surface oxide on surfactant-free gold nanoparticles laser-ablated in water. *J. Phys. Chem. C*, 111(46):17221 – 17226, 2007.

[83] Jean-Philippe Sylvestre, Suzie Poulin, Andrei V. Kabashin, Edward Sacher, Michel Meunier und John H. T. Luong. Surface chemistry of gold nanoparticles produced by laser ablation in aqueous media. *J. Phys. Chem. B*, 108(43):16864 – 16869, 2004.

[84] Jean-Philippe Sylvestre, Andrei V. Kabashin, Edward Sacher, Michel Meunier und John H. T. Luong. Stabilization and size control of gold nanoparticles during laser ablation in aqueous cyclodextrins. *J. Am. Chem. Soc.*, 126(23):7176 – 7177, 2004.

[85] Vivian Merk, Christoph Rehbock, Felix Becker, Ulrich Hagemann, Hermann Nienhaus und Stephan Barcikowski. In situ non-dlvo stabilization of surfactant-free, plasmonic gold nanoparticles: Effect of hofmeister's anions. *Langmuir*, 30(15):4213 – 4222, 2014.

[86] Johanna G. Walter, Svea Petersen, Frank Stahl, Thomas Scheper und Stephan Barcikowski. Laser ablation-based one-step generation and bio-functionalization of gold nanoparticles conjugated with aptamers. *J. Nanobiotechnol.*, 8(1):1 – 11, 2010.

[87] E. J. W. Verwey. Theory of the stability of lyophobic colloids. *J. Phys. Colloid Chem.*, 51(3):631 – 636, 1947.

[88] E. J. W. Verwey und J. Th. G. Overbeek. *Theory of the stability of lyophobic colloids*. Elsevier Publishing Company, Inc., 1948.

[89] B. Derjaguin und L. Landau. Theory of the stability of strongly charged lyophobic sols and of the adhesion of strongly charged particles in solutions of electrolytes. *Acta Phys. Chim.*, pages 30 – 59, 1941.

[90] Guozhong Cao. *Nanostructures and Nanomaterials: Synthesis, Properties and Applications*. Imperial College Press, 2004.

[91] H.-D. Dörfler. *Grenzflächen und kolloid-disperse Systeme*. Springer-Verlag Berlin / Heidelberg, 1. Auflage, 2002.

- [92] Gianpietro Malescio. Intermolecular potentials - past, present, future. *Nat. Mater.*, 2(8):501 – 503, 2003.
- [93] Laurent Pilon, Hainan Wang und Anna d'Entremont. Recent advances in continuum modeling of interfacial and transport phenomena in electric double layer capacitors. *J. Electrochem. Soc.*, 162:A5158 – A5178, 2015.
- [94] Gregory V. Lowry, Reghan J. Hill, Stacey Harper, Alan F. Rawle, Christine Ogilvie Hendren, Fred Klaessig, Ulf Nobbmann, Philip Sayre und John Rumble. Guidance to improve the scientific value of zeta-potential measurements in nanoelectronics. *Environ. Sci.: Nano*, 3:953 – 965, 2016.
- [95] Christian Pfeiffer, Christoph Rehbock, Dominik Hühn, Carolina Carrillo-Carrion, Dorleta Jimenez de Aberasturi, Vivian Merk, Stephan Barcikowski und Wolfgang J. Parak. Interaction of colloidal nanoparticles with their local environment: the (ionic) nanoenvironment around nanoparticles is different from bulk and determines the physico-chemical properties of the nanoparticles. *J. R. Soc. Interface*, 11(96):20130931: 1 – 13, 2014.
- [96] Tennyson L. Doane, Chi-Hung Chuang, Reghan J. Hill und Clemens Burda. Nanoparticle zeta -potentials. *Acc. Chem. Res.*, 45(3):317 – 326, 2012.
- [97] Massimo Zimbone, Pietro Baeri, Lucia Calcagno, Paolo Musumeci, Annalinda Contino, Maria Luisa Barcellona und Gabriele Bonaventura. Dynamic light scattering on bioconjugated laser generated gold nanoparticles. *PLoS ONE*, 9(3):1 – 6, 03 2014.
- [98] Christoph Rehbock, Jurij Jakobi, Lisa Gamrad, Selina Van der Meer, Daniela Tiedemann, Ulrike Taylor, Wilfried Kues, Detlef Rath und Stephan Barcikowski. Current state of laser synthesis of metal and alloy nanoparticles as ligand-free reference materials for nano-toxicological assays. *Beilstein J. Nanotechnol.*, 5:1523 – 1541, 2014.
- [99] Sébastien Besner, Andrei V. Kabashin und Michel Meunier. Fragmentation of colloidal nanoparticles by femtosecond laser-induced supercontinuum generation. *Appl. Phys. Lett.*, 89:233122: 1 – 3, 2006.
- [100] Ana Menéndez-Manjón und Stephan Barcikowski. Hydrodynamic size distribution of gold nanoparticles controlled by repetition rate during pulsed laser ablation in water. *Appl. Surf. Sci.*, 257(9):4285 – 4290, 2011.

- [101] Shuguang Wang, Wentong Lu, Oleg Tovmachenko, Uma Shanker Rai, Hongtao Yu und Paresh Chandra Ray. Challenge in understanding size and shape dependent toxicity of gold nanomaterials in human skin keratinocytes. *Chem. Phys. Lett.*, 463:145 – 149, 2008.
- [102] Li Shang, Linxiao Yang, Jürgen Seiter, Marita Heinle, Gerald Brenner-Weiss, Dagmar Gerthsen und G. Ulrich Nienhaus. Nanoparticles interacting with proteins and cells: A systematic study of protein surface charge effects. *Adv. Mater. Interfaces*, 1(2):1 – 10, 2014.
- [103] Eleonore Fröhlich. The role of surface charge in cellular uptake and cytotoxicity of medical nanoparticles. *Int. J. Nanomedicine*, 7:5577 – 5591, 2012.
- [104] Ulrike Taylor, Anette Barchanski, Wiebke Garrels, Sabine Klein, Wilfried Kues, Stephan Barcikowski und Detlef Rath. *Nano-Biotechnology for Biomedical and Diagnostic Research*, chapter Toxicity of Gold Nanoparticles on Somatic and Reproductive Cells, pages 125–133. Springer Netherlands, Dordrecht, 2012.
- [105] Nikolai Khlebtsov und Lev Dykman. Biodistribution and toxicity of engineered gold nanoparticles: a review of in vitro and in vivo studies. *Chem. Soc. Rev.*, 40:1647 – 1671, 2011.
- [106] Linlin Sun, Dianjun Liu und Zhenxin Wang. Functional gold nanoparticle-peptide complexes as cell-targeting agents. *Langmuir*, 24(18):10293 – 10297, 2008.
- [107] Dinesh Shenoy, Wei Fu, Jane Li, Curtis Crasto, Graham Jones, Charles DiMarzio, Srinivas Sridhar und Mansoor Amiji. Surface functionalization of gold nanoparticles using hetero-bifunctional poly(ethylene glycol) spacer for intracellular tracking and delivery. *Int. J. Nanomed.*, 1(1):51 – 57, 2006.
- [108] Min Zhou, Baoxiang Wang, Zbigniew Rozynek, Zhaohui Xie, Jon Otto Fossum, Xiaofeng Yu und Steinar Raaen. Minute synthesis of extremely stable gold nanoparticles. *Nanotechnology*, 20(50):505606: 1 – 10, 2009.
- [109] Jessica Ponti, Renato Colognato, Fabio Franchini, Sabrina Gioria, Federica Simonelli, Kamel Abbas, Chiara Ubaldi, C. James Kirkpatrick, Uwe Holzwarth und Francois Rossi. A quantitative in vitro approach to study the intracellular fate of gold nanoparticles: from synthesis to cytotoxicity. *Nanotoxicology*, 3(4):296 – 306, 2009.
- [110] Priyanka Murawala, S. M. Phadnis, R. R. Bhonde und B. L. V. Prasad. In situ synthesis of water dispersible bovine serum albumin capped gold and silver

nanoparticles and their cytocompatibility studies. *Colloids Surf., B*, 73(2):224 – 228, 2009.

[111] Ulrike Taylor, Annette Barchanski, Svea Petersen, Wilfried August Kues, Ulrich Baulain, Lisa Gamrad, Laszlo Sajti, Stephan Barcikowski und Detlef Rath. Gold nanoparticles interfere with sperm functionality by membrane adsorption without penetration. *Nanotoxicology*, 8:118 – 127, 2013.

[112] Catherine M. Goodman, Catherine D. McCusker, Tuna Yilmaz und Vincent M. Rotello. Toxicity of gold nanoparticles functionalized with cationic and anionic side chains. *Bioconjugate Chem.*, 15(4):897 – 900, 2004.

[113] Ellen E. Connor, Judith Mwamuka, Anand Gole, Catherine J. Murphy und Michael D. Wyatt. Gold nanoparticles are taken up by human cells but do not cause acute cytotoxicity. *Small*, 1(3):325 – 327, 3 2005.

[114] Yu-Shiun Chen, Yao-Ching Hung, Ian Liao und G. Steve Huang. Assessment of the in vivo toxicity of gold nanoparticles. *Nanoscale Res. Lett.*, 4(8):858 – 864, 2009.

[115] Tatsiana Mironava, Michael Hadjiargyrou, Marcia Simon, Vladimir Jurukovski und Miriam H. Rafailovich. Gold nanoparticles cellular toxicity and recovery: Effect of size, concentration and exposure time. *Nanotoxicology*, 4(1):120 – 137, 2010.

[116] Yu Pan, Sabine Neuss, Annika Leifert, Monika Fischler, Fei Wen, Ulrich Simon, Günter Schmid, Wolfgang Brandau und Willi Jahnen-Dechent. Size-dependent cytotoxicity of gold nanoparticles. *Small*, 3(11):1941 – 1949, 11 2007.

[117] Jesus M. de la Fuente and Catherine C. Berry. Tat peptide as an efficient molecule to translocate gold nanoparticles into the cell nucleus. *Bioconjugate Chem.*, 16(5):1176 – 1180, 2005.

[118] Ravi Shukla, Vipul Bansal, Minakshi Chaudhary, Atanu Basu, Ramesh R. Bhonde und Murali Sastry. Biocompatibility of gold nanoparticles and their endocytotic fate inside the cellular compartment: A microscopic overview. *Langmuir*, 21(23):10644 – 10654, 2005.

[119] Tobias Pfaller, Victor Puentes, Eudald Casals, Albert Duschl und Gertie J. Oostingh. In vitro investigation of immunomodulatory effects caused by engineered inorganic nanoparticles - the impact of experimental design and cell choice. *Nanotoxicology*, 3(1):46 – 59, 2009.

- [120] Christopher J. Gannon, Chitta Ranjan Patra, Resham Bhattacharya, Priyabrata Mukherjee und Steven A. Curley. Intracellular gold nanoparticles enhance non-invasive radiofrequency thermal destruction of human gastrointestinal cancer cells. *J. Nanobiotechnol.*, 6(1):2: 1 – 9, 2008.
- [121] Yinghua Qu und Xiaoying Lü. Aqueous synthesis of gold nanoparticles and their cytotoxicity in human dermal fibroblastsâ€fetal. *Biomed. Mater.*, 4(2):025007: 1 – 5, 2009.
- [122] Jameel Ahmad Khan, Beena Pillai, Taposh Kumar Das, Yogendra Singh und Souvik Maiti. Molecular effects of uptake of gold nanoparticles in hela cells. *ChemBioChem*, 8(11):1237 – 1240, 2007.
- [123] Gaiping Li, Dan Li, Lixue Zhang, Junfeng Zhai und Erkang Wang. One-step synthesis of folic acid protected gold nanoparticles and their receptor-mediated intracellular uptake. *Chem. Eur. J.*, 15(38):9868 – 9873, 2009.
- [124] Alexander G. Tkachenko, Huan Xie, Yanli Liu, Donna Coleman, Joseph Ryan, Wilhelm R. Glomm, Mathew K. Shipton, Stefan Franzen und Daniel L. Feldheim. Cellular trajectories of peptide-modified gold particle complexes: Comparison of nuclear localization signals and peptide transduction domains. *Bioconjugate Chem.*, 15(3):482 – 490, 2004.
- [125] Dongkyu Kim, Sangjin Park, Jae Hyuk Lee, Yong Yeon Jeong und Sangyong Jon. Antibiofouling polymer-coated gold nanoparticles as a contrast agent for in vivo x-ray computed tomography imaging. *J. Am. Chem. Soc.*, 129(24):7661 – 7665, 2007.
- [126] A. Simon-Deckers, E. Brun, B. Gouget, M. Carrière und C. Sicard-Roselli. Impact of gold nanoparticles combined to x-ray irradiation on bacteria. *Gold Bulletin*, 41(2):187 – 194, 2008.
- [127] Nadine Pernodet, Xiaohua Fang, Yuan Sun, Asya Bakhtina, Aditi Ramakrishnan, Jonathan Sokolov, Abraham Ulman und Miriam Rafailovich. Adverse effects of citrate/gold nanoparticles on human dermal fibroblasts. *Small*, 2(6):766 – 773, 6 2006.
- [128] Ulrike Taylor, Christoph Rehbock, Carmen Streich, Detlef Rath und Stephan Barcikowski. Rational design of gold nanoparticle toxicology assays: a question of exposure scenario, dose and experimental setup. *Nanomedicine (London, U. K.)*, 13(9):1971 – 1989, 2014.

- [129] Philipp Christen und Rolf Jaussi. *Biochemie*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, 2005.
- [130] Bruce Alberts, Alexander Johnson, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts und Peter Walter. *Molecular Biology of the Cell*. Garland Science Custom Publishing, 4. Auflage, 2002. The Structure and Function of DNA.
- [131] Leslie A. Pray. Discovery of dna structure and function: Watson and crick. *Nat. Educ.*, 1(1):100: 1 – 7, 2008.
- [132] Dwaine A Braasch und David R Corey. Locked nucleic acid (lna): fine-tuning the recognition of dna and rna. *Chem. Biol.*, 8(1):1 – 7, 2001.
- [133] Arnold Grünweller und Roland K. Hartmann. Locked nucleic acid oligonucleotides. *Biodrugs*, 21:235 – 243, 2007.
- [134] Dwight S. Seferos, David A. Giljohann, Nathaniel L. Rosi und Chad A. Mirkin. Locked nucleic acid-nanoparticle conjugates. *ChemBioChem*, 8(11):1230 – 1232, 2007.
- [135] Sakari Kauppinen, Birte Vester und Jesper Wengel. Locked nucleic acid (lna): High affinity targeting of rna for diagnostics and therapeutics. *Drug Discovery Today: Technol.*, 2(3):287 – 290, 2005.
- [136] Fiona McKenzie, Karen Faulds und Duncan Graham. Sequence-specific dna detection using high-affinity lna-functionalized gold nanoparticles. *Small*, 3(11):1866 – 1868, 2007.
- [137] Michael M. Seidman und Peter M. Glazer. The potential for gene repair via triple helix formation. *J. Clin. Invest.*, 112:487 – 494, 2003.
- [138] Marion D. Johnson III und Jacques R. Fresco. Third-strand in situ hybridization (tish) to non-denatured metaphase spreads and interphase nuclei. *Chromosoma*, 108(3):181 – 189, 1999.
- [139] Melissa P. Knauert und Peter M. Glazer. Triplex forming oligonucleotides: sequence-specific tools for gene targeting. *Hum. Mol. Genet.*, 10(20):2243 – 2251, 2001.
- [140] Sara Trabulo, Ana Luisa Cardoso, Miguel Mano und Maria C. Pedroso De Lima. Cell-penetrating peptides - mechanisms of cellular uptake and generation of delivery systems. *Pharmaceuticals*, 3(4):961 – 993, 2010.

- [141] Aparna Nori, Keith D. Jensen, Monica Tijerina, Pavla Kopecková und Jindrich Kopecek. Tat-conjugated synthetic macromolecules facilitate cytoplasmic drug delivery to human ovarian carcinoma cells. *Bioconjugate Chem.*, 14(1):44 – 50, 2003.
- [142] Anna Astriab-Fisher, Dimitri Sergueev, Michael Fisher, Barbara Ramsay Shaw und R. L. Juliano. Conjugates of antisense oligonucleotides with the tat and antennapedia cell-penetrating peptides: Effects on cellular uptake, binding to target sequences, and biologic actions. *Pharm. Res.*, 19(6):744 – 754, 2002.
- [143] Ming Zhao, Moritz F. Kircher, Lee Josephson und Ralph Weissleder. Differential conjugation of tat peptide to superparamagnetic nanoparticles and its effect on cellular uptake. *Bioconjugate Chem.*, 13(4):840 – 844, 2002.
- [144] Judith Mueller, Ines Kretzschmar, Rudolf Volkmer und Prisca Boisguerin. Comparison of cellular uptake using 22 cpps in 4 different cell lines. *Bioconjugate Chem.*, 19(12):2363 – 2374, 2008.
- [145] Irene Martín, Meritxell Teixidó und Ernest Giralt. Design, synthesis and characterization of a new anionic cell-penetrating peptide: Sap(e). *ChemBioChem*, 12(6):896 – 903, 2011.
- [146] Alan D. Frankel und Carl O. Pabo. Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus. *Cell*, 55(6):1189 – 1193, 1988.
- [147] Erez Koren und Vladimir P. Torchilin. Cell-penetrating peptides: breaking through to the other side. *Trends Mol. Med.*, 18(7):385 – 393, 2012.
- [148] Gisela Tünnemann, Robert M. Martin, Simone Haupt, Christoph Patsch, Frank Edenhofer und M. Cristina Cardoso. Cargo-dependent mode of uptake and bioavailability of tat-containing proteins and peptides in living cells. *The FASEB Journal*, 20(11):1775 – 1784, 2006.
- [149] Terra B. Potocky, Anant K. Menon und Samuel H. Gellman. Cytoplasmic and nuclear delivery of a tat-derived peptide and a β -peptide after endocytic uptake into hela cells. *J. Biol. Chem.*, 278(50):50188 – 50194, 2003.
- [150] Falk Duchardt, Mariola Fotin-Mleczek, Heinz Schwarz, Rainer Fischer und Roland Brock. A comprehensive model for the cellular uptake of cationic cell-penetrating peptides. *Traffic*, 8(7):848 – 866, 2007.

- [151] Annette Barchanski, Ulrike Taylor, Csaba L. Sajti, Lisa Gamrad, Wilfried A. Kues, Detlef Rath und Stephan Barcikowski. Bioconjugated gold nanoparticles penetrate into spermatozoa depending on plasma membrane status. *J. Biomed. Nanotechnol.*, 11(9):1597 – 1607, 2015.
- [152] Lai-Sheng Wang. Covalent gold. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 12:8694 – 8705, 2010.
- [153] Mohammad A. Behnajady, Shahrzad Yavari und Nasser Modirshahla. Investigation on adsorption capacity of tio₂-p25 nanoparticles in the removal of a mono-azo dye from aqueous solution: A comprehensive isotherm analysis. *Chem. Ind. Chem. Eng. Q.*, 20(1):97 – 107, 2014.
- [154] A. O. Dada, A. P. Olalekan, A. M. Olatunya und O. Dada. Langmuir, freundlich, temkin and dubinin–radushkevich isotherms studies of equilibrium sorption of zn²⁺ unto phosphoric acid modified rice husk. *IOSR J. Appl. Chem.*, 3:38 – 45, 2012.
- [155] Xu Zhang, Mark R. Servos und Juewen Liu. Surface science of dna adsorption onto citrate-capped gold nanoparticles. *Langmuir*, 28(8):3896 – 3902, 2012.
- [156] Nancy Tawil, Ali Hatef, Edward Sacher, Mathieu Maisonneuve, Thomas Gervais, Rosemonde Mandeville und Michel Meunier. Surface plasmon resonance determination of the binding mechanisms of l-cysteine and mercaptoundecanoic acid on gold. *J. Phys. Chem. C*, 117(13):6712 – 6718, 2013.
- [157] Kristin B. Cederquist und Christine D. Keating. Curvature effects in dna:au nanoparticle conjugates. *ACS Nano*, 3(2):256 – 260, 2009.
- [158] Haley D. Hill, Jill E. Millstone, Matthew J. Banholzer und Chad A. Mirkin. The role radius of curvature plays in thiolated oligonucleotide loading on gold nanoparticles. *ACS Nano*, 3(2):418 – 424, 2009.
- [159] Masihul Hasan, Donald Bethell und Mathias Brust. The fate of sulfur-bound hydrogen on formation of self-assembled thiol monolayers on gold: 1h nmr spectroscopic evidence from solutions of gold clusters. *J. Am. Chem. Soc.*, 124(7):1132 – 1133, 2002.
- [160] Izabela I. Rzeznicka, Junseok Lee, Petro Maksymovych und Jr. John T. Yates. Nondissociative chemisorption of short chain alkanethiols on au(111). *J. Phys. Chem. B*, 109(33):15992 – 15996, 2005.

- [161] Frederik Tielens und Elizabeth Santos. Au and S-H bond formation/breaking during the formation of alkanethiol SAMs on Au(111): A theoretical study. *J. Phys. Chem. C*, 114(20):9444 – 9452, 2010.
- [162] Jian-Ge Zhou und Frank Hagelberg. Do methanethiol adsorbates on the Au(111) surface dissociate? *Phys. Rev. Lett.*, 97:045505: 1 – 4, 2006.
- [163] John E. Matthiesen, Deepa Jose, Christopher M. Sorensen und Kenneth J. Klabunde. Loss of hydrogen upon exposure of thiol to gold clusters at low temperature. *J. Am. Chem. Soc.*, 134(22):9376 – 9379, 2012.
- [164] Laxman Kankate, Andrey Turchanin und Armin Gözhäuser. On the release of hydrogen from the S-H groups in the formation of self-assembled monolayers of thiols. *Langmuir*, 25(18):10435 – 10438, 2009.
- [165] Linette M. Demers, Chad A. Mirkin, Robert C. Mucic, Robert A. Reynolds, Robert L. Letsinger, Robert Elghanian und Garimella Viswanadham. A fluorescence-based method for determining the surface coverage and hybridization efficiency of thiol-capped oligonucleotides bound to gold thin films and nanoparticles. *Anal. Chem.*, 72(22):5535 – 5541, 2000.
- [166] Anton Fojtik und Arnim Henglein. Laser ablation of films and suspended particles in a solvent: formation of cluster and colloid solution. *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.*, 97:252 – 254, 1993.
- [167] Arnim Henglein. Physicochemical properties of small metal particles in solution: "microelectrode" reactions, chemisorption, composite metal particles and the atom-to-metal transition. *J. Phys. Chem.*, 97(21):5457 – 5471, 1993.
- [168] Andrei V. Kabashin und Michel Meunier. Laser ablation-based synthesis of functionalized colloidal nanomaterials in biocompatible solutions. *J. Photochem. Photobiol., A*, 182(3):330 – 334, 2006.
- [169] M. Maciulevicius, A. Vincius, M. Brikas, A. Butsen, N. Tarasenko, N. Tarasenko und G. Raciukaitis. On-line characterization of gold nanoparticles generated by laser ablation in liquids. *Phys. Procedia*, 41:531 – 538, 2013.
- [170] Yuen-Yan Fong, Jason R. Gascooke, Bradley R. Visser, Hugh H. Harris, Bruce C. C. Cowie, Lars Thomsen, Gregory F. Metha und Mark A. Buntine. Influence of cationic surfactants on the formation and surface oxidation states of gold nanoparticles produced via laser ablation. *Langmuir*, 29(40):12452 – 12462, 2013.

- [171] Yuen-Yan Fong, Jason R. Gascooke, Bradley R. Visser, Gregory F. Metha und Mark A. Buntine. Laser-based formation and properties of gold nanoparticles in aqueous solution: Formation kinetics and surfactant-modified particle size distributions. *J. Phys. Chem. C*, 114(38):15931 – 15940, 2010.
- [172] Fumitaka Mafuné, Jun-ya Kohno, Yoshihiro Takeda und Tamotsu Kondow. Formation of gold nanonetworks and small gold nanoparticles by irradiation of intense pulsed laser onto gold nanoparticles. *J. Phys. Chem. B*, 107(46):12589 – 12596, 2003.
- [173] Wei Qian, Makoto Murakami, Yuki Ichikawa und Yong Che. Highly efficient and controllable pegylation of gold nanoparticles prepared by femtosecond laser ablation in water. *J. Phys. Chem. C*, 115(47):23293 – 23298, 2011.
- [174] Emilia Giorgetti, Anna Giusti, Simona C. Laza, Paolo Marsili und Francesco Giammanco. Production of colloidal gold nanoparticles by picosecond laser ablation in liquids. *Phys. Status Solidi A*, 204(6):1693 – 1698, 2007.
- [175] Emilia Giorgetti, Anna Giusti, Francesco Giammanco, Paolo Marsili und Simona Laza. Dendrimer-capped nanoparticles prepared by picosecond laser ablation in liquid environment. *Molecules*, 14(9):3731 – 3753, 2009.
- [176] Sébastien Besner, Andrei V. Kabashin, Francoise M. Winnik und Michel Meunier. Ultrafast laser based "green" synthesis of non-toxic nanoparticles in aqueous solutions. *Appl. Phys. A*, 93(4):955 – 959, 2008.
- [177] Sébastien Besner, Andrei V. Kabashin, Francoise M. Winnik und Michel Meunier. Synthesis of size-tunable polymer-protected gold nanoparticles by femtosecond laser-based ablation and seed growth. *J. Phys. Chem. C*, 113(22):9526 – 9531, 2009.
- [178] Fumitaka Mafuné, Jun-ya Kohno, Yoshihiro Takeda und Tamotsu Kondow. Dissociation and aggregation of gold nanoparticles under laser irradiation. *J. Phys. Chem. B*, 105(38):9050 – 9056, 2001.
- [179] Fumitaka Mafuné, Jun-ya Kohno, Yoshihiro Takeda und Tamotsu Kondow. Growth of gold clusters into nanoparticles in a solution following laser-induced fragmentation. *J. Phys. Chem. B*, 106(34):8555 – 8561, 2002.
- [180] Andrei V. Kabashin, Michel Meunier, Christopher Kingston und John H. T. Luong. Fabrication and characterization of gold nanoparticles by femtosecond laser

ablation in an aqueous solution of cyclodextrins. *J. Phys. Chem. B*, 107(19):4527 – 4531, 2003.

[181] Mushtaq A. Sobhan, Michael J. Withford und Ewa M. Goldys. Enhanced stability of gold colloids produced by femtosecond laser synthesis in aqueous solution of ctab. *Langmuir*, 26(5):3156 – 3159, 2010.

[182] Galina Marzun, Junji Nakamura, Xiaorui Zhang, Stephan Barcikowski und Philipp Wagener. Size control and supporting of palladium nanoparticles made by laserablation in saline solution as a facile route to heterogeneous catalysts. *Appl. Surf. Sci.*, 348:75 – 84, 2015.

[183] Shyjumon Ibrahimkutti, Philipp Wagener, Tomy Dos Santos Rolo, Dmitry Karpov, Andreas Menzel, Tilo Baumbach, Stephan Barcikowski und Anton Plech. A hierarchical view on material formation during pulsed-laser synthesis of nanoparticles in liquid. *Sci. Rep.*, 5:16313:1 – 11, 2015.

[184] Khaled Metwally, Serge Mensah und Guillaume Baffou. Fluence threshold for photothermal bubble generation using plasmonic nanoparticles. *J. Phys. Chem. C*, 119(51):28586 – 28596, 2015.

[185] Klaus D. Sattler. *Handbook of Nanophysics: Nanoparticles and Quantum Dots*, volume 3. CRC Press Taylor & Francis Group, 2011.

[186] Gaelle Charron, Dominik Hühn, Aurélie Perrier, Laure Cordier, Christopher J. Pickett, Thomas Nann und Wolfgang J. Parak. On the use of ph titration to quantitatively characterize colloidal nanoparticles. *Langmuir*, 28(43):15141 – 15149, 2012.

[187] John Gregory. *Particles in Water: Properties and Processes*, volume 1. CRC Press Taylor & Francis Group, 2006.

[188] Chandra Mohan. Buffers - a guide for the preparation and use of buffers in biological systems. Calbiochem Biochemicals, 2003.

[189] Sandra Jendrzej, Bilal Goekce, Vincenzo Amendola und Stephan Barcikowski. Barrierless growth of precursor-free, ultrafast laser-fragmented noble metal nanoparticles by colloidal atom clusters - a kinetic in situ study. *J. Colloid Interface Sci.*, 463:299 – 307, 2016.

- [190] Teresa López-León, Ana B. Jódar-Reyes, Delfi Bastos-González und Juan L. Ortega-Vinuesa. Hofmeister effects in the stability and electrophoretic mobility of polystyrene latex particles. *J. Phys. Chem. B*, 107(24):5696 – 5708, 2003.
- [191] Fernando Vereda, Alberto Martín-Molina, Roque Hidalgo-Alvarez und Manuel Quesada-Perez. Specific ion effects on the electrokinetic properties of iron oxide nanoparticles: experiments and simulations. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 17:17069 – 17078, 2015.
- [192] Helen K. Roobottom und H. Donald B. Jenkins. Thermochemical radii of complex ions. *J. Chem. Educ.*, 76(11):1570 – 1573, 1999.
- [193] Pierandrea Lo Nostro, Barry W. Ninham, Silvia Milani, Antonella Lo Nostro, Giovanna Pesavento und Piero Baglioni. Hofmeister effects in supramolecular and biological systems. *Biophys. Chem.*, 124(3):208 – 213, 2006. Ion Hydration Special Issue.
- [194] Andreas Eiberweiser, Andreas Nazet, Glenn Hefter und Richard Buchner. Ion hydration and association in aqueous potassium phosphate solutions. *J. Phys. Chem. B*, 119(16):5270 – 5281, 2015.
- [195] Jong-Won Park und Jennifer S. Shumaker-Parry. Structural study of citrate layers on gold nanoparticles: Role of intermolecular interactions in stabilizing nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.*, 136(5):1907 – 1921, 2014.
- [196] Zhi Li, Rongchao Jin, Chad A Mirkin und Robert L Letsinger. Multiple thiol-anchor capped dna-gold nanoparticle conjugates. *Nucleic Acids Res.*, 30(7):1558 – 1562, 2002.
- [197] Zhenghua Tang, Bin Xu, Baohua Wu, Markus W. Germann und Gangli Wang. Synthesis and structural determination of multidentate 2,3-dithiol-stabilized Au clusters. *J. Am. Chem. Soc.*, 132(10):3367 – 3374, 2010.
- [198] C. V. Krishnan und M. Garnett. Electrochemical behavior of the super antioxidant, lipoic acid. *Int. J. Electrochem. Sci.*, 6:3607 – 3630, 2011.
- [199] I. M. Gascoigne und G. K. Radda. The chemistry of flavins and flavoproteins iii. the reaction of dihydrolipoic acid with flavins. *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.*, 131(3):498 – 507, 1967.

- [200] Pär Sandström, Mila Boncheva und Björn Åkerman. Nonspecific and thiol-specific binding of dna to gold nanoparticles. *Langmuir*, 19(18):7537 – 7543, 2003.
- [201] Teresa Pellegrino, Ralph A. Sperling, A. Paul Alivisatos und Wolfgang J. Parak. Gel electrophoresis of gold-dna nanoconjugates. *J. Biomed. Biotechnol.*, 2007:1 – 9, 2008.
- [202] Elisha Krieg, Haim Weissman, Elijah Shirman, Eyal Shimoni und Boris Rybtchinski. A recyclable supramolecular membrane for size-selective separation of nanoparticles. *Nat. Nano*, 6(3):141 – 146, 2011.
- [203] Li Shang, Shaojun Dong und G. Ulrich Nienhaus. Ultra-small fluorescent metal nanoclusters: Synthesis and biological applications. *Nano Today*, 6(4):401 – 418, 2011.
- [204] Wolfgang J. Parak, Teresa Pellegrino, Christine M. Micheel, Daniele Gerion, Shara C. Williams und A. Paul Alivisatos. Conformation of oligonucleotides attached to gold nanocrystals probed by gel electrophoresis. *Nano Lett.*, 3(1):33 – 36, 2003.
- [205] R. A. Sperling, T. Liedl, S. Duhr, S. Kudera, M. Zanella, C.-A. J. Lin, W. H. Chang, D. Braun und W. J. Parak. Size determination of (bio)conjugated water-soluble colloidal nanoparticles: A comparison of different techniques. *J. Phys. Chem. C*, 111(31):11552 – 11559, 2007.
- [206] W. Peter Wuelfing, Stephen M. Gross, Deon T. Miles und Royce W. Murray. Nanometer gold clusters protected by surface-bound monolayers of thiolated poly(ethylene glycol) polymer electrolyte. *J. Am. Chem. Soc.*, 120(48):12696 – 12697, 1998.
- [207] Nkem Alele, René Streubel, Lisa Gamrad, Stephan Barcikowski und Mathias Ulbricht. Ultrafiltration membrane-based purification of bioconjugated gold nanoparticle dispersions. *Sep. Purif. Technol.*, 157:120 – 130, 2016.
- [208] H. M. F. Freundlich. *Z. Phys. Chem.*, 57A:385 – 470, 1906.
- [209] Lisa Gamrad, Christoph Rehbock, Astrid M. Westendorf, Jan Buer, Stephan Barcikowski und Wiebke Hansen. Efficient nucleic acid delivery to murine regulatory t cells by gold nanoparticle conjugates. *Sci. Rep.*, 6:28709: 1 – 8, 2016.

- [210] Philipp Wagener, Andreas Schwenke und Stephan Barcikowski. How citrate ligands affect nanoparticle adsorption to microparticle supports. *Langmuir*, 28:6132 – 6140, 2012.
- [211] Rongchao Jin, Guosheng Wu, Zhi Li, Chad A. Mirkin und George C. Schatz. What controls the melting properties of dna-linked gold nanoparticle assemblies? *J. Am. Chem. Soc.*, 125(6):1643 – 1654, 2003.
- [212] Steven B. Smith, Yujia Cui und Carlos Bustamante. Overstretching b-dna: The elastic response of individual double-stranded and single-stranded dna molecules. *Science*, 271(5250):795 – 799, 1996.
- [213] Jong-Won Park und Jennifer S. Shumaker-Parry. Strong resistance of citrate anions on metal nanoparticles to desorption under thiol functionalization. *ACS Nano*, 9(2):1665 – 1682, 2015.
- [214] Michael J. Hostetler, Stephen J. Green, Jennifer J. Stokes und Royce W. Murray. Monolayers in three dimensions: Synthesis and electrochemistry of w-functionalized alkanethiolate-stabilized gold cluster compounds. *J. Am. Chem. Soc.*, 118(17):4212 – 4213, 1996.
- [215] Vito Di Noto und Mauro Mecozzi. Determination of seawater salinity by ultraviolet spectroscopic measurements. *Appl. Spectrosc.*, 51(9):1294 – 1302, 1997.
- [216] Waldemar Nowicki und Grazyna Nowicka. Verification of the schulze-hardy rule: A colloid chemistry experiment. *J. Chem. Educ.*, 71(7):624 – 626, 1994.
- [217] A. Menéndez-Manjón, B. N. Chichkov und S. Barcikowski. Influence of water temperature on the hydrodynamic diameter of gold nanoparticles from laser ablation. *J. Phys. Chem. C*, 114(6):2499 – 2504, 2010.
- [218] Jean-Louis Mergny und Laurent Lacroix. Analysis of thermal melting curves. *Oligonucleotides*, 13(6):515 – 537, 2003.
- [219] Roger M. Wartell und Albert S. Benight. Thermal denaturation of dna molecules: A comparison of theory with experiment. *Phys. Rep.*, 126(2):67 – 107, 1985.
- [220] Fiona McKenzie, Karen Faulds und Duncan Graham. Lna functionalized gold nanoparticles as probes for double stranded dna through triplex formation. *Chem. Commun.*, 20:2367 – 2369, 2008.

- [221] Garima Khandelwal und Jayaram Bhyravabhotla. A phenomenological model for predicting melting temperatures of dna sequences. *PLoS ONE*, 5(8):1 – 9, 08 2010.
- [222] D.W. Ussery. Dna denaturation. In Sydney Brenner and Jefferey H. Miller, editors, *Encyclopedia of Genetics*, pages 550 – 553. Academic Press, New York, 2001.
- [223] Judith Krawinkel, Undine Richter, Maria Leilani Torres-Mapa, Martin Westermann, Lisa Gamrad, Christoph Rehbock, Stephan Barcikowski und Alexander Heisterkamp. Optical and electron microscopy study of laser-based intracellular molecule delivery using peptide-conjugated photodispersible gold nanoparticle agglomerates. *J. Nanobiotechnol.*, 14(1):1 – 14, 2016.
- [224] Ulrike Taylor, Anette Barchanski, Wilfried Kues, Stephan Barcikowski und Detlef Rath. Impact of metal nanoparticles on germ cell viability and functionality. *Reprod. Domest. Anim.*, 47:359 – 368, 2012.
- [225] Marian Mulisch und Ulrich Welsch. *Romeis Mikroskopische Technik*, volume 18. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, 2010.
- [226] Peter W. Atkins und Julio de Paula. *Physikalische Chemie*, volume 4. WILEY-VCH Verlag, 2006.
- [227] Mikhail Y. Berezin und Samuel Achilefu. Fluorescence lifetime measurements and biological imaging. *Chem. Rev.*, 110(5):2641 – 2684, 2010.
- [228] M.T. Stöckl und A. Herrmann. Detection of lipid domains in model and cell membranes by fluorescence lifetime imaging microscopy. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.*, 1798(7):1444 – 1456, 2010. Microscopy Imaging of Membrane Domains.
- [229] Artem Pliss, Lingling Zhao, Tymish Y. Ohulchanskyy, Junle Qu und Paras N. Prasad. Fluorescence lifetime of fluorescent proteins as an intracellular environment probe sensing the cell cycle progression. *ACS Chem. Biol.*, 7(8):1385 – 1392, 2012.
- [230] Takakazu Nakabayashi, Hui-Ping Wang, Masataka Kinjo und Nobuhiro Ohta. Application of fluorescence lifetime imaging of enhanced green fluorescent protein to intracellular ph measurements. *Photochem. Photobiol. Sci.*, 7:668 – 670, 2008.
- [231] *Molecular Probes Handbook*. Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, 11. Auflage, 2010.
- [232] Gary Durack und J. Paul Robinson. *Emerging Tools for Single-Cell Analysis*. Wiley-Liss, Inc., 2000.

- [233] Inc. ISS, ISS, Inc.; Lifetime Data of Selected Fluorophores; http://www.iss.com/resources/reference/data_tables/LifetimeDataFluorophores.html; aufgerufen am 30.04.2016.
- [234] Dror Fixler, Tsviya Nayhoz und Krishanu Ray. Diffusion reflection and fluorescence lifetime imaging microscopy study of fluorophore-conjugated gold nanoparticles or nanorods in solid phantoms. *ACS Photonics*, 1(9):900 – 905, 2014.
- [235] Jia Li, Alexey V. Krasavin, Linden Webster, Paulina Segovia, Anatoly V. Zayats und David Richards. Spectral variation of fluorescence lifetime near single metal nanoparticles. *Sci. Rep.*, 5:21349: 1 – 9, 2016.
- [236] Jue-Yeon Lee, Yoo-Na Seo, Hyun-Jung Park, Yoon-Jeong Park und Chong-Pyoung Chung. The cell-penetrating peptide domain from human heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor (hb-egf) has anti-inflammatory activity in vitro and in vivo. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 419(4):597 – 604, 2012.
- [237] Peter S. James, Conor Hennessy, Torunn Berge und Roy Jones. Compartmentalisation of the sperm plasma membrane: a frap, flip and spfi analysis of putative diffusion barriers on the sperm head. *J. Cell Sci.*, 117(26):6485 – 6495, 2004.
- [238] Caroline A. Wolfe, Peter S. James, Alan R. Mackie, Shab Ladha und Roy Jones. Regionalized lipid diffusion in the plasma membrane of mammalian spermatozoa. *Biol. Reprod.*, 59(6):1506 – 1514, 1998.
- [239] Ömer Faruk Karatas, SezginErdinc, Ömer Aydin und Mustafa Culha. Interaction of gold nanoparticles with mitochondria. *Colloids Surf. B*, 71(2):315 – 318, 2009.
- [240] Björn M. Reinhard, Merek Siu, Harish Agarwal, A. Paul Alivisatos und Jan Liphardt. Calibration of dynamic molecular rulers based on plasmon coupling between gold nanoparticles. *Nano Lett.*, 5(11):2246 – 2252, 2005.
- [241] Frank Bernhard. *Handbuch der Technischen Temperaturmessung*, volume 2. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2014.
- [242] Erik B. van Munster, Jan Stap, Ron A. Hoebe, Gerard J. te Meerman und Jacob A. Aten. Difference in volume of x- and y-chromosome-bearing bovine sperm heads matches difference in dna content. *Cytometry*, 35(2):125 – 128, 1999.
- [243] Tahia D. Fernández, John R. Pearson, Manuel Pernia Leal, Maria J. Torres, Miguel Blanca, Cristobalina Mayorga und Xavier Le Guével. Intracellular accumulation

and immunological properties of fluorescent gold nanoclusters in human dendritic cells. *Biomaterials*, 43:1 – 12, 2015.

[244] Hung-Jen Yen, Shan-hui Hsu und Ching-Lin Tsai. Cytotoxicity and immunological response of gold and silver nanoparticles of different sizes. *Small*, 5(13):1553 – 1561, 2009.

[245] Nuri Oh und Ji-Ho Park. Endocytosis and exocytosis of nanoparticles in mammalian cells. *Int. J. Nanomed.*, 9:51 – 63, 2014.

[246] Ekaterina Y. Lukianova-Hleb, Daniel S. Wagner, Malcolm K. Brenner und Dmitri O. Lapotko. Cell-specific transmembrane injection of molecular cargo with gold nanoparticle-generated transient plasmonic nanobubbles. *Biomaterials*, 33(21):5441 – 5450, 2012.

[247] Weina Li, Lili Wang, Changli Jiang, Hong Li, Kuo Zhang, Yujin Xu, Qiang Hao, Meng Li, Xiaochang Xue, Xin Qin, Cun Zhang, Huixuan Wang, Wei Zhang und Yingqi Zhang. Uxt is a novel regulatory factor of regulatory t cells associated with foxp3. *Eur. J. Immunol.*, 44(2):533 – 544, 2014.

[248] Leonardo Chicaybam, Andressa Laino Sodre, Bianca Azevedo Curzio und Martin Hernan Bonamino. An efficient low cost method for gene transfer to t lymphocytes. *PLoS ONE*, 8(3):1 – 11, 2013.

[249] Yangbing Zhao, Zhili Zheng, Cyrille J. Cohen, Luca Gattinoni, Douglas C. Palmer, Nicholas P. Restifo, Steven A. Rosenberg und Richard A. Morgan. High-efficiency transfection of primary human and mouse t lymphocytes using rna electroporation. *Mol. Ther.*, 13(1):151 – 159, 2006.

[250] Huaying Zhao, Andrea Balbo, Howard Metger, Robert Clary, Rodolfo Ghirlando und Peter Schuck. Improved measurement of the rotor temperature in analytical ultracentrifugation. *Anal. Biochem.*, 451:69 – 75, 2014.

[251] L. Minai, D. Yeheskely-Hayon und D. Yelin. High levels of reactive oxygen species in gold nanoparticle-targeted cancer cells following femtosecond pulse irradiation. *Sci Rep.*, 3:2146: 1 – 7, 2013.

[252] Wen Jiang, KimBetty Y. S., James T. Rutka und ChanWarren C. W. Nanoparticle-mediated cellular response is size-dependent. *Nat. Nano*, 3(3):145 – 150, 2008.

- [253] Jaspreet K. Vasir und Vinod Labhasetwar. Biodegradable nanoparticles for cytosolic delivery of therapeutics. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 59:718 – 728, 2007.
- [254] B. Devika Chithrani und Warren C. W. Chan. Elucidating the mechanism of cellular uptake and removal of protein-coated gold nanoparticles of different sizes and shapes. *Nano Lett.*, 7:1542 – 1550, 2007.
- [255] Huajian Gao, Wendong Shi und Lambert B. Freund. Mechanics of receptor-mediated endocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102:9469 – 9474, 2005.
- [256] Irene Canton und Guiseppe Battaglia. Endocytosis at the nanoscale. *Chem. Soc. Rev.*, 41:2718 – 2739, 2012.
- [257] Cheng Peng, Robert E. Palazzo und Ingrid Wilke. Laser intensity dependence of femtosecond near-infrared optoinjection. *Phys. Rev. E*, 75:041903: 1 – 8, 2007.
- [258] Nikolai G. Khlebtsov und Lev A. Dykman. Optical properties and biomedical applications of plasmonic nanoparticles. *J. Quant. Spectrosc. Radiat. Transf.*, 111:1 – 35, 2010.
- [259] Boris Khlebtsov, Vladimir Zharov, Andrei Melnikov, Valery Tuchin und Nikolai G. Khlebtsov. Optical amplification of photothermal therapy with gold nanoparticles and nanoclusters. *Nanotechnology*, 17:5167 – 5179, 2006.
- [260] M. Quinten. Local fields close to the surface of nanoparticles and aggregates of nanoparticles. *Appl. Phys. B*, 73:245 – 255, 2001.
- [261] Xiaoming Yang, Yawen Luo, Yan Zhuo, Yuanjiao Feng und Shanshan Zhu. Novel synthesis of gold nanoclusters templated with L-tyrosine for selective analyzing tyrosinase. *Anal. Chim. Acta*, 840:87 – 92, 2014.
- [262] Hak Soo Choi, Wenhao Liu, Preeti Misra, Eiichi Tanaka, John P. Zimmer, Binil Itty Ipe, Mounji G. Bawendi und John V. Frangioni. Renal clearance of quantum dots. *Nat. Biotechnol.*, 25:1165 – 1170, 2007.
- [263] C. E. Catrenich und M. H. Chestnut. Character and origin of vacuoles induced in mammalian cells by the cytotoxin of helicobacter pylori. *J. Med. Microbiol.*, 37:389 – 395, 1992.
- [264] M. Pelton, J. Aizpurua und G. Bryant. Metal-nanoparticle plasmonics. *Laser Photonics Rev.*, 2:136 – 159, 2008.

- [265] Shuichi Hashimoto, Daniel Werner und Takayuki Uwada. Studies on the interaction of pulsed lasers with plasmonic gold nanoparticles toward light manipulation, heat management und nanofabrication. *J. Photochem. Photobiol. C*, 13(1):28 – 54, 2012.
- [266] Renat R. Letfullin, Charles Joenathan, Thomas F. George und Vladimir P. Zharov. Laser-induced explosion of gold nanoparticles: potential role for nanophotothermolysis of cancer. *Nanomedicine*, 1:473 – 480, 2006.
- [267] V. K. Pustovalov, A. S. Smetannikov und V. P. Zharov. Photothermal and accompanied phenomena of selective nanophotothermolysis with gold nanoparticles and laser pulses. *Laser Phys. Lett.*, 5:775, 2008.
- [268] Vladimir P. Zharov, Elena N. Galitovskaya, Carl Johnson und Thomas Kelly. Synergistic enhancement of selective nanophotothermolysis with gold nanoclusters: potential for cancer therapy. *Lasers Surg. Med.*, 37:219 – 226, 2005.
- [269] Sara Peeters, Michael Kitz, Stefan Preisser, Antoinette Wetterwald, Barbara Rothen-Rutishauser, George N. Thalmann, Christina Brandenberger, Arthur Bailey und Martin Frenz. Mechanisms of nanoparticle-mediated photomechanical cell damage. *Biomed. Opt. Express.*, 3:435 – 446, 2012.
- [270] Daniel Werner und Shuichi Hashimoto. Improved working model for interpreting the excitation wavelength- and fluence-dependent response in pulsed laser-induced size reduction of aqueous gold nanoparticles. *J. Phys. Chem. C*, 115:5063 – 5072, 2011.
- [271] Edward P. Furlani, Ioannis H. Karampelas und Qian Xie. Analysis of pulsed laser plasmon-assisted photothermal heating and bubble generation at the nanoscale. *Lab Chip*, 12:3707 – 3719, 2012.
- [272] Ya-Yung Lee, Silpi Datta und Jean-Philippe Pellois. Real-time fluorescence detection of protein transduction into live cells. *J. Am. Chem. Soc.*, 130:2398 – 2399, 2008.
- [273] Alfredo Erazo-Oliveras, Nandhini Muthukrishnan, Ryan Baker, Ting-Yi Wang und Jean-Philippe Pellois. Improving the endosomal escape of cell-penetrating peptides and their cargos: strategies and challenges. *Pharmaceuticals*, 5:1177 – 1209, 2012.

- [274] E. Neumann, M. Schaefer-Ridder, Y. Wang und P. H. Hofschneider. Gene transfer into mouse lyoma cells by electroporation in high electric fields. *EMBO J.*, 1(7):841 – 845, 1982.
- [275] Pablo E. Visconti, Janice L. Bailey, Grace D. Moore, Dieyun Pan, Patricia Olds-Clarke und Gregory S. Kopf. Capacitation of mouse spermatozoa. i. correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation. *Development*, 121(4):1129 – 1137, 1995.
- [276] Lisa Gamrad, Roberto Mancini, Daniel Werner, Daniela Tiedemann, Ulrike Taylor, Anna Ziefuß, Christoph Rehbock, Sabine Klein, Wilfried Kues, Stephan Barcikowski und Detlef Rath. Triplex-hybridizing bioconjugated gold nanoparticles for specific Y-chromosome sequence targeting of bull spermatozoa. *Analyst*, Akzeptiertes Manuskript, <http://dx.doi.org/10.1039/C6AN02461K>, 2017.

7. Anhang

7.1. Material und Methoden

In diesem Kapitel werden die verwendeten analytischen Methoden beschrieben sowie die Materialien und Analysegeräte, welche für die experimentellen Verfahren eingesetzt wurden, aufgelistet.

7.1.1. Analytische Methoden

7.1.1.1. Kolloidanalyse

Bestimmung der optischen Eigenschaften

Die optischen Eigenschaften der Nanopartikel-Kolloide und Konjugate wurden mittels *UV-Vis-Spektrometrie* bestimmt. Mit dieser Methode erfolgte standardmäßig die Untersuchung der Goldkonzentration, des Agglomerationsgrads und der Oberflächenplasmonenresonanz der Kolloide. Die Goldkonzentration wurde anhand der Interband-Absorption bei 380 nm mittels einer geeigneten Kalibration (Anhang: Abbildung 82) ermittelt. Der Agglomerationsgrad wurde mittels Primärpartikelindex (PPI; Kapitel 3.2, Formel 1) bestimmt. Die Charakterisierung des Kolloids anhand der Oberflächenplasmonenresonanz (SPR, engl. surface plasmon resonance) erfolgte durch Extraktion der Lage des SPR-Peaks in dem aufgenommenen UV-Vis-Spektrum.

Die *UV-Vis-Spektrometrie* wurde mit einem Spektrometer der Firma Thermo Scientific (*Evolution 201*) und der dazu kompatiblen Software *Insight 1.4.45* durchgeführt. Falls nicht anders erwähnt, erfolgten die Messungen bei Raumtemperatur in einer 750 µL oder 1500 µL Quarzküvette mit einer optischen Weglänge von 10 mm. Die eingestellten Parameter und Eigenschaften des Gerätes sind in Tabelle 2 aufgelistet.

Tabelle 2: Parameter und Einstellungen des UV-Vis Spektrometers.

Ausstattung und Genauigkeit		Parameter	Einstellung
Lichtquelle	Xenon Blitzlichtlampe	Scangeschwindigkeit	1200nm/min
Detektor	Doppelte Silizium-Photodiode	Integrationszeit	0,05 s
Baseline Ebenheit	$\pm 0,001$ A	Glättung	mittel
Genauigkeit der Extinktion	1A: $\pm 0,006$ A	Wellenlängenbereich	190 – 1000 nm $\pm 0,8$ nm
Rauschen	1A: $\leq 0,0005$ A	Spektrale Bandweite	1 nm

Bestimmung der Nanopartikelgröße

Die Größe der Nanopartikel wurde mit verschiedenen Methoden wie der *Transmissionselektronenmikroskopie* (TEM) (Kapitel 7.1.1.3), der *Analytischen Scheibenzentrifuge* (ASZ), der *Analytischen Ultrazentrifugation* (AUZ) und der *Dynamischen Lichtstreuung* (DLS) untersucht. Hierbei wird mittels TEM der Feret-Durchmesser bestimmt. Die anderen Methoden dienen zur Bestimmung der hydrodynamischen Größe der Partikel. Im Folgenden werden die zu der Analyse wichtigen Parameter und Einstellungen kurz erläutert.

Die Analyse der hydrodynamischen Partikelgröße mittels *analytischer Scheibenzentrifuge* (ASZ) der Firma *CPS Instruments Inc.* erfolgte auf Basis der Partikelsedimentation durch einen Gradienten bestehend aus einer 8%-igen und 24%-igen Saccharose-Lösung. Für die Kalibrierung der Messungen wurde ein Standard aus 237 nm großen Polyvinylchlorid-Partikeln verwendet. Die Messung der Partikel erfolgte bei einer Detektorwellenlänge von 405 nm. Die Analyse wurde mit Hilfe der Software *DC Control Systems* (Version 11) aufgezeichnet. Die eingestellten Parameter für die Charakterisierung von Goldnanopartikeln sind in Tabelle 3 aufgelistet.

Tabelle 3: Parameter und Einstellungen zur Partikelgrößenanalyse mittels ASZ.

Parameter	Einstellung	Parameter	Einstellung
Drehzahl	24.000 RPM	Dichte des Kalibrationsstandards	1,385 g/cm ³
Gemessener Größenbereich	3 – 100 nm	Halbwertbreite Standard	0,1
Dichte des Partikelmaterials	19,3 g/cm ³	Dichte des Lösungsmittels	1,064 g/cm ³
Absorption des Partikels	1,952	Brechungsindex	1,367
Brechungsindex des Partikels	1,47	Viskosität	1,5 cps
Formfaktor	1,0	Messzeit	15 – 30 min

Es wurde außerdem die *analytische Ultrazentrifugation* zur Bestimmung der Nanopartikel-Größenverteilung in Flüssigkeiten eingesetzt. Diese Messmethode basiert ebenfalls auf der Sedimentation, also der Wanderung, der Partikel in Abhängigkeit der Geschwindigkeit und ihrer Größe und Masse. Für die Messungen wurde mit dem Gerät *Proteomelab™ XL-I* der Firma *Beckman Coulter* in Verbindung mit der Software *Proteomelab V6.2* und einem 8-Loch Rotor (An-50Ti) gearbeitet. Weiterhin sind 12 mm hohe Doppelsektor-Mittelstücke aus Epon verwendet worden, welche ein Probenvolumen von 400 µL fassen. Zur Detektion wurde der Interferenz-Detektor verwendet. Es wurden jeweils 999 Scans aufgezeichnet, wobei die Zentrifuge jeweils nach ca. 24 h gestoppt wurde. Die Zentrifugationsgeschwindigkeit betrug 3.000 RPM und 50.000 RPM. Für die Auswertung mit dem Programm *Sedfit* (Version 14.81) wurde jeweils jeder 10. Scan verwendet. Die bei der Auswertung eingestellten Parameter sind in Tabelle 4 aufgelistet.

Tabelle 4: Parameter und Einstellungen zur Partikelgrößenanalyse mittels AUZ.

Parameter	Einstellung
Auflösung N	200; 400
s-Wert-Bereich	0-2000; 0-10.000
Formfaktor	1,0
Partielles spezifisches Volumen	0,051813 cm ³ /g
Dichte des Lösungsmittels	0,9982 g/cm ³
Viskosität des Lösungsmittels	0,01 Poise

Die Ladung, insbesondere das Zetapotential, der Nanopartikel und Konjugate wurde ebenfalls mittels *Dynamischer Lichtstreuung* ermittelt. Hierbei kam ebenfalls der *Zetasizer Nano ZS* (Firma *Malvern Instruments Int.*) und die *Zetasizer Software 7.03* zum Einsatz. Die eingestellten Parameter zu diesen Messungen sind ebenfalls in Tabelle 5 aufgeführt.

Parameter allgemein	Einstellung	Parameter Größe	Einstellung
Brechungsindex AuNP	0,197	Messwinkel	173°
Absorption AuNP	3,091	Messzelle	Einweg-Kapillarzelle / 3mL Zelle
Brechungsindex DNA	2,1		
Absorption DNA	0,184	Parameter Zetapotential	Einstellung
Temperatur	25°C	Dielektrische Konstante	78,5
Viskosität Lösungsmittel	0,8872 cP	Modell	Hückel
Brechungsindex Lösungsmittel	1,33	Messzelle	Einweg-Kapillarzelle
Messzeit	10-100 Durchgänge		
Anzahl an Messungen pro Probe	3		

7.1.1.2. Bindungs-Assays

Aufreinigung von Nanopartikel-Konjugaten

Die in dieser Arbeit hergestellten Nanopartikel-Konjugate wurden mit verschiedenen Methoden aufgereinigt, um die Funktionalisierung der Nanopartikel quantifizieren zu können und eine Aussage über die Bindung der Liganden zu machen. Hierzu zählen die *Gel-Elektrophorese*, *Ultrazentrifugation* und *Zentrifugationsfiltration*.

Bei der *Gel-Elektrophorese* wurden Gele aus 1,5% und 2,0% Agarose verwendet. Die Gele wurden in eine Elektrophorese-Kammer gelegt, welche mit Tris-Borat-EDTA-Puffer (TBE) gefüllt wurde bis das Gel bedeckt war. Die Elektrophorese wurde bei ~100 V und ~200 A für 20-60 Minuten abhängig von der Laufgeschwindigkeit der Partikel durchgeführt. Anschließend wurden die Banden, in denen sich die Partikel angesammelt haben und aufgrund der Partikel rot gefärbt waren, mit einem Skalpell ausgeschnitten. Für die Extraktion der Konjugate aus den Gelen wurden die ausgeschnittenen Gel-Banden in einen Dialyse-Schlauch (50 kDa RC-Membran, RC: regenerierte Zellulose) gelegt und die Konjugate wurden bei gleichen Bedingungen wie die eigentliche Elektrophorese in der Elektrophorese-Kammer aus dem Gel in die Lösung gebracht. Das Konjugat lag dann frei vor und konnte aus dem Dialyse-Schlauch gewonnen werden. Nach mehrmaligem Waschen mit Reinstwasser (MilliQ-Wasser) in Zentrifugationsfiltern (50 kDa RC-Membran) wurden die Konjugate bezüglich ihrer optischen Eigenschaften charakterisiert.

Für die Aufreinigung der Konjugate lediglich mit Hilfe der *Zentrifugationsfiltration* wurden *Amicon Ultra-15 Zentrifugen-Filtereinheiten* (Merck Millipore), welche eine Membran aus regenerierter Zellulose mit einer Ausschlussgrenze (engl.: Cut Off) von 30 kDa enthalten, verwendet. 1,5 mL der Probe wurden in einer Zentrifuge der Firma *Hettich* (*Universal 32*) bei 3000 RPM und 4000 RPM (= 664 x g und 1180 x g) jeweils für 20 min, 30 min, 40 min und 50 min zentrifugiert. Das Filtrat wurde anschließend aufgefangen und das Konjugat auf 1,5 mL mit MilliQ-Wasser aufgefüllt. Dieser Vorgang wurde, wenn nicht anders erwähnt, sechs Mal wiederholt.

Die Aufreinigung von Nanopartikel-Konjugaten mittels *Ultrazentrifugation* wurde mit einer *Optima Max-XP* Ultrazentrifuge der Firma *Beckman Coulter* durchgeführt. Hierzu wurde der Rotor *TLA-55* mit einem Fassungsvermögen von 12 1,5 mL Probengefäßen eingesetzt. Die Proben wurden abhängig von den verwendeten Ligandentypen bei 30.000 x g oder 100.000 x g für eine Stunde bei 7°C zentrifugiert. Der Überstand wurde zur Vermessung aufgefangen und der Rückstand, welcher meist als Pellet vorliegt, mit Hilfe von Ultraschall in MilliQ-Wasser wieder redispersiert.

Detektierbarkeit von fluoreszenzmarkierten Nanopartikeln

Fluoreszenzmarkierte Nanopartikel wurden mittels *Fluoreszenz-Spektrometrie* untersucht. Hierzu wurde ein *Varian Cary Eclipse* (*Agilent Varian*) Spektrometer verwendet und mit der Software *Cary-Eclipse Scan Application* (Version 1.1 (132)) gesteuert. Die eingestellten Parameter sind in Tabelle 6 aufgelistet.

Tabelle 6: Parameter und Einstellungen des Fluoreszenz-Spektrometers.

Parameter	Einstellung
Anregungswellenlänge	Alexa488/FITC: 488 nm; Cy5: 633 nm
Emissionswellenlängenbereich	Alexa488/FITC: 495 - 1000 nm; Cy5: 640 - 1000 nm
Anregungsblende	5 nm
Emissionsblende	5 nm
Scangeschwindigkeit	600 nm/min
PMT Detektor Spannung	600 V

7.1.1.3. Bildgebung

Die bildgebenden Methoden in dieser Arbeit sind zum einen die *konfokale Mikroskopie* zusammen mit *Fluoreszenzlebensdauer-Messungen* und zum anderen die *Transmissionselektronenmikroskopie*.

Bei der ersten Methode wurde mit einem *Epifluoreszenz-Konfokal-Mikroskop TCS SP8* der Firma *Leica* und der Software *Leica LAS AF3* und *Leica LAS X* gearbeitet. Für die Messungen der *Fluoreszenzlebensdauer* wurde zusätzlich ein *TCSPC Modul PicoHarp 300* und die Software *Symphotime SPT2* verwendet. In beiden Fällen wurde ein Weißlicht-Laser bei 70% Energie und ein Objektiv des Typs *HC PL APO CS2* mit einer 40-fachen Vergrößerung, einer numerischen Apertur von 1,3 und einem Arbeitsabstand von 0,24 mm verwendet. Als Immersion wurde Öl eingesetzt. Die

Bildgröße wurde auf 512x512 und 1024x1024 Pixel festgelegt, die Schichtdicke einer Ebene betrug 1,039 μm und die Lochblende war mit einem Faktor von 0,75 a.u. geöffnet. Bei der Aufnahme der Fluoreszenzlebensdauer wurde bis zu einer Anzahl von 1.000 Photonen pro Pixel gemessen. Weitere Parameter und Einstellungen befinden sich in Tabelle 7.

Tabelle 7: Anregungs- und Emissionswellenlängen für die eingesetzten Farbstoffe.

Parameter	Anregungs-Wellenlänge	Emissions-Wellenlänge	Detektor ⁵⁶
AuNP	532 nm	534-590 nm	HyD
Alexa 488	495 nm	505-600 nm	PMT/HyD
FITC	495 nm	505-600 nm	PMT/HyD
DAPI	405 nm	415-600 nm	PMT
Propidiumiodid	535 nm	545-720 nm	PMT
Zellen	/	/	PMT Trans

Die *Transmissionselektronenmikroskopie* wurde ebenfalls als bildgebende Methode verwendet. Hierbei wurden die Proben mit einem Gerät der Firma Zeiss (*EM 910*) abgebildet. Für die Aufnahme von Nanopartikeln wurde eine Beschleunigungsspannung von 120 kV angelegt. Bei der Aufnahme von Nanopartikeln in biologischer Umgebung wie z.B. Zellen betrug die Beschleunigungsspannung 80 kV. Die Auflösung bei diesem Modell beträgt 0,4 nm.

⁵⁶ Die unterschiedlichen Detektoren sind durch die entsprechenden Abkürzungen aufgeführt, die Erklärung der Abkürzungen sind in Kapitel 7.3 aufgeführt.

7.1.2. Analysengeräte

Im Folgenden (Tabelle 8) sind die eingesetzten analytischen Geräte aufgelistet. Neben der Angabe des Modells und des Herstellers sind auch die Messmethodik, die Software und die zu messenden Parameter angegeben.

Tabelle 8: Aufstellung der verwendeten Analysen- und Aufreinigungsgeräte.

Analysengerät	Hersteller	Modell	Messmethodik	Software	Messwert
UV/Vis-Spektrometer	Thermo Scientific	Evolution 201	Photometrie	Insight 1.4.45	Extinktion
Dynamische Lichtstreuung	Malvern Instruments Ltd	Zetasizer Nano ZS	Partikelstreuung	Zetasizer Software 7.03	Hydrodynamische Größe, Zetapotential
Analytische Scheibenzentrifuge	CPS Instruments Inc.	---	Absorption	DC Control System Version 11	Hydrodynamische Größe
Transmissions-elektronenmikroskop	Zeiss	EM910	Mikroskopie	---	Abbildung
Analytische Ultrazentrifuge	Beckman Coulter	Proteomelab™ XL-I	Photometrie Interferenz	Proteomelab V6.2	Größe
Gel-Elektrophorese	BioRad	-	-	-	-
Ultrazentrifuge	Beckman Coulter	Optima Max-XP	-	-	-
Zentrifuge	Hettich	Universal 32	-	-	-
Fluoreszenz-Spektrometer	Agilent Technologies	Cary Eclipse	Photometrie	Cary-Eclipse-Bio	Fluoreszenz-Intensität
Konfokalmikroskop	Leica	TCS SP8 gSTED Konfokal	Mikroskopie	LAS AF3, LAS X	Abbildung
FLIM	Leica	TCSPC Modul PicoHarp 300	Fluoreszenz-Lebensdauer	Symphony SPT2	Lebensdauer

7.1.3. Verwendete Materialien

Die Materialien, welche in den Experimenten dieser Arbeit verwendet wurden, sind im Folgenden aufgelistet. Hierbei wird zwischen Oligonukleotiden, Peptiden, biologischen Proben und zusätzlich verwendeten Materialien, wie Salze, Gold und andere Molekülen, unterschieden.

Die Auflistung der verwendeten Oligonukleotide enthält neben der Benennung die Sequenz, die Anzahl an Basen, die eingesetzten Reinigungsschritte und den Hersteller. (Tabelle 9)

Tabelle 9: Auflistung der verwendeten Oligonukleotide.

Name	Sequenz 5' - - - 3' (/3' - - - 5')	Anzahl Basen	Reinigung	Hersteller/ Lieferant
DNA _{AG} 10	AGA AAG GAA G	10	2 X HPLC	Purimex
DNA _{CT} 10	TCT TTC CTT C	10	2 X HPLC	Purimex
DNA _{AG} 18T ₁₀ 18	AAG AGG AGG AGA AAG GAA TTT TTT TTT TAA GAG GAG GAG AAA GGA A	46	HPLC	Purimex
DNA _{AG/CT} 19	AAG GGA AAG GAA GGA AGA G / TTC CCT TTC CTT CCT TCT C	2 x 19	-	FLI (RM) ⁵⁷
DNA _{AG/CT} 20	AGA AAG GAA GAA AAG GAA AG / TCT TTC CTT CTT TTC CTT TC	2 x 20	-	FLI (RM) ⁵⁷
DNA _{AG/CT} 22	GAG GGA GGG AAA AGG GAG GAA G / CTC CCT CCC TTT TCC CTC CTT C	2 x 22	-	FLI (RM) ⁵⁷
DNA _{AG/CT} 40	AGA AAG GAA GAA AAG GAA AGA GAA AGG AAG AAA AGG AAA G / TCT TTC CTT CTT TTC CTT TCT CTT TCC TTC TTT TCC TTT C	2 x 40	-	FLI (RM) ⁵⁷
5'DNA _{CT} 22	HS-CTC CCT CCC TTT TCC CTC CTT C	22	2 X HPLC	Purimex
5'DNA _{CT} 22- Cy5	HS-CTC CCT CCC TTT TCC CTC CTT C-Cy5	22	3 X HPLC	Purimex
5'DNA _{CT} 22- Alexa488	HS-CTC CCT CCC TTT TCC CTC CTT C-Alexa488	22	3 X HPLC	Purimex

⁵⁷ Die Herstellung des Doppelstrangs wurde von Dr. Roberto Mancini (Friedrich-Löffler-Institut, Leitung: Prof. Dr. Detlef Rath) durchgeführt und für diese Experimente zur Verfügung gestellt.

Name	Sequenz 5' - - - - 3' (/3' - - - - 5')	Anzahl Basen	Reinigung	Hersteller/ Lieferant
5'DNA _{CT26T10}	HS- TTT TTT TTT TCC TCC CTC CTC CCT CC	26	2 X HPLC	Purimex
5'DNA _{CT28T10}	HS-TTT TTT TTT TTT CCT TTC TCC TCC TCT T	28	2 X HPLC	Purimex
3'DNA _{CT28T10}	TTC CTT TCT CCT CCT CTT TTT TTT TTT T-SH	28	3 X HPLC	Purimex
5'DNA _{CT30T10}	HS-TTT TTT TTT TCT TTC CTT TTC TTC CTT TCT	30	2 X HPLC	Purimex
5'LNA10	HS-YXY TYX XYT X	10	2 X HPLC/PAGE	Purimex
5'LNA19	HS-TYX XXY TYX XYT XXY TCY C	19	2 X HPLC	Purimex
5'LNA20 _{T20}	HS-TTT TTT TTT TTT TTT TTT TT	20	2 X HPLC	Purimex
5'LNA22	HS-XYX XXY XXX YTT YXX XXY XYT X	22	2 X HPLC/PAGE	Purimex
5'LNA22-Cy5	HS-XYX XXY XXX YTT YXX XXY XYT X-Cy5	22	3 X HPLC/PAGE	Purimex
5'LNA22-Alexa488	HS-XYX XXY XXX YTT YXX XXY XYT X-Alexa488	22	3 X HPLC/PAGE	Purimex
5'LNA30 _{T10}	HS-TTT TTT TTT TYX YTY XXY TXY TYT XXY TYX	30	2 X HPLC/PAGE	Purimex
5'LNA36 _{T10}	HS- TTT TTT TTT TTY TXY XXY XXY XTY TXX YTX YXX TYT	36	2 X HPLC	Purimex
siRNA	AGC UGA CCC UGA AGU UCA UTT / TTU CGA CUG GGA CUU CAA GUA	2 x 21	HPLC	ambion by life techno- logies

Die verwendeten Peptide werden durch ihre Benennung, ihre Sequenz, die Anzahl der Aminosäuren und die Nettoladung beschrieben. Die Reinheit und der Hersteller sind ebenfalls aufgeführt. (Tabelle 10)

Tabelle 10: Auflistung der verwendeten Peptide.

Name	Sequenz	Anzahl Aminosäuren	Nettoladung (pH 7), IEP	Reinheit	Hersteller
Dodeca-Glutaminsäure	CEEEEEEEEEEE EEEW	14	-12, pH 0,34	>95%	ChinaPeptides Co., Ltd, Genosphere Biotechnologies
SAP	CGGWVEPPP VEPPPVEPPP	19	-3,1, pH 0,9	-	MPI (KP) ⁵⁸
CWKLPVM	CWKLPVM- [amide]	7	+1, pH 9,4	-	MPI (KP) ⁵⁸
NLS _{Cys}	CWGGGPKKK RKVED	14	+3, pH 10,4	>95%	ChinaPeptides Co., Ltd, Genosphere Biotechnologies
NLS _{Cys} (K-mca)	CWGGGPKKK RKVED (K-mca)	14	+3, pH 10,4	>95%	ChinaPeptides Co., Ltd, Genosphere Biotechnologies
NLS _{Cys} (FITC)	CWGGGPKKK RKVED (FITC)	14	+3, pH 10,4	>95%	ChinaPeptides Co., Ltd, Genosphere Biotechnologies
NLS	GWGGGPKKK RKVED	14	+3, pH 10,7	>95%	Genosphere Biotechnologies
DB-Tat	GCGGVWSP WYGGSWG G RKKRRQRRR PQ	27	+8; PH 12,1	-	MPI (KP) ⁵⁸
Deca-Arginin	CWRRRRRRRR RRR	12	+10, pH 12,7	>95%	ChinaPeptides Co., Ltd
Dodeca-Arginin	CWRRRRRRRR RRRRR	14	+12, pH 12,8	>95%	ChinaPeptides Co., Ltd

⁵⁸ Die Herstellung der Peptide wurde von Dr. Kalina Peneva (Max-Planck-Institut für Polymer-Forschung, Direktor: Prof. Dr. Klaus Müllen) koordiniert und für diese Experimente zur Verfügung gestellt.

Die biologischen Materialien wurden ausschließlich von den Kooperationspartnern zur Verfügung gestellt. Tabelle 11 enthält eine Auflistung inklusive der Angabe der entsprechenden Anwendung.

Tabelle 11: Auflistung der eingesetzten biologischen Materialien.

Material	Hersteller	Anwendung
genomische DNA	FLI (RM) ⁵⁹	Hybridisierung
demembralisierte Spermienköpfe	FLI (RM) ⁵⁹	Hybridisierung
Spermien	FLI (UT, SK) ⁶⁰	Zellpenetration
Splenozyten	ZMB (WH) ⁶¹	Zellpenetration und Transfektion
Krebszellen	IAO (JK) ⁶²	Zellpenetration

Alle weiteren Substanzen, welche verwendet wurden, sind Tabelle 12 zu entnehmen. Hierbei sind neben der Benennung der Materialien auch die Abkürzung oder Summenformel, die Reinheit und der Hersteller der Substanzen aufgeführt.

⁵⁹ Die Synthese des biologischen Materials wurde von Dr. Roberto Mancini (Friedrich-Löffler-Institut, Leitung: Prof. Dr. Detlef Rath) durchgeführt und für die Experimente zur Verfügung gestellt.

⁶⁰ Die Inkubation von Spermien mit verschiedenen Nanopartikel-Konjugaten und der weiteren Präparation zur Analyse wurde von Dr. Ulrike Taylor und Dr. Sabine Klein (Friedrich-Löffler-Institut, Leitung: Prof. Dr. Detlef Rath) durchgeführt und schließlich wurden die Proben für die Analyse zur Verfügung gestellt.

⁶¹ Die beschriebenen Experimente, welche in dieser Arbeit mit Splenozyten erfolgten, wurden von Prof. Dr. Wiebke Hansen (Institut für Medizinische Mikrobiologie, Universitätsklinikum Essen) durchgeführt, ausgewertet und zur Verfügung gestellt.

⁶² Die in dieser Arbeit mit ZMTH3-Krebszellen beschriebenen Experimente wurden von Judith Krawinkel (Institut für Angewandte Optik, Friedrich-Schiller-Universität Jena, Leitung: Prof. Dr. Alexander Heisterkamp) durchgeführt, ausgewertet und zur Verfügung gestellt.

Tabelle 12: Auflistung der Materialien, welche in dieser Arbeit verwendet wurden.

Material	Summenformel/ Abkürzung	Reinheit	Hersteller/ Lieferant
2,2 nm Goldnanocluster	AuNC _{2 nm}	-	Nanopartz™
34 nm Goldnanopartikel	AuNP _{34 nm}	-	Nanopartz™
Agarose	-		AppliChem GmbH
Bovines Serumalbumin	BSA	≥98,0%	Sigma Aldrich
Cetyltrimethylammonium-bromid	C ₁₉ H ₄₂ BrN, CTAB	≥99,0%	AnalaR NORMAPUR
D-Fructose	C ₆ H ₁₂ O ₆	≥99,0%	Sigma Aldrich
Dihydroliponsäure	C ₈ H ₁₇ O ₂ S ₂ , DHLs	≥95,0%	Cayman Chemical
Dinatriumhydrogenphosphat	HNa ₂ PO ₄	≥99,0%	Sigma Aldrich
Gentamicinsulfat	C ₆₀ H ₁₂₅ N ₁₅ O ₂₅ S	-	AppliChem GmbH
Goldfolie	Au	99,99%	Allgemeine Gold
Hoechst 33342	C ₂₇ H ₃₁ Cl ₃ N ₆ O	-	FLI
Liponsäure	C ₈ H ₁₅ O ₂ S ₂ , LS	≥99,0%	Sigma Aldrich
Magnesiumchlorid	MgCl ₂	Ph. Eur.	Merck KG
N,N'-Bis-(3-aminopropyl)-1,4-diaminobutan	C ₁₀ H ₂₆ N ₄ , Spermin	≥98,0%	AppliChem GmbH
Natriumchlorid	NaCl	99,90%	AnalaR NORMAPUR
Trinatriumcitrat	Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ , Na ₃ Citrat	≥99,0%	AppliChem GmbH
Natriumdihydrogenphosphat	H ₂ NaPO ₄	99,00%	Merck KG
Natriumlaurylsulfat	C ₁₂ H ₂₅ NaO ₄ S, SDS	≥98,5%	Sigma Aldrich
Natronlauge	NaOH	99,00%	AnalaR NORMAPUR
Phosphatgepufferte Salzlösung	PBS	-	AppliChem GmbH
Polyethylenglycol 400	(C ₂ H ₄ O) ₄₀₀ OH ₂ , PEG ₄₀₀	-	Sigma Aldrich
Polyvinylpyrrolidon 58k	(C ₆ H ₉ NO) ₅₈₀₀₀ , PVP _{58k}	-	ThermoFisher
Propidiumiodid	C ₂₇ H ₃₄ I ₂ N ₄ , PI	-	FLI
Reinstwasser	MilliQ-Wasser	-	-
Salzsäure	HCl	p. A.	Bernd Kraft GmbH
Tris-Borat-EDTA-Puffer	TBE	-	Amresco
Tris-hydroxymethyl-aminomethan	C ₄ H ₁₁ O ₃ N	≥99,8%	Sigma Aldrich
Zitronensäure (Monohydrat)	C ₆ H ₈ O ₇ · H ₂ O	>99,0%	Sigma Aldrich

7.2. Experimentelle Durchführung

Im Folgenden werden die Methoden zur Herstellung und weiterführenden Verwendung der Goldnanopartikel in ihrer standardmäßig eingesetzten Vorgehensweise beschrieben. Sofern vereinzelte Methoden von den hier beschriebenen Parametern abweichen, ist dies jeweils an der entsprechenden Stelle erwähnt.

7.2.1. Herstellung ligandenfreier Goldnanopartikel

Die ligandenfreien Goldnanopartikel wurden mittels Laserablation in Flüssigkeit produziert. In diesem Verfahren wurde die Ablation in einem 30 mL-Satzreaktor aus Teflon durchgeführt. Der Laserstrahl eines Pikosekundenlasers (*Atlantic, Ekspla*) mit einer Wellenlänge von 1064 nm wurde schließlich über verschiedene Strahlführungskomponenten durch ein Quarzfenster des Satzreaktors auf ein 0,5 mm dickes Goldtarget fokussiert. Der Laserstrahl wurde mit Hilfe eines Scannersystems (*ScanCube10, ScanLab*) und der Software *LaserDesk* in einem Arbeitsabstand von 11,6 cm von der Scanner-Linse spiralförmig auf dem Goldtarget bewegt. Die Ablation wurde für eine Dauer von 10 Minuten unter ständigem Rühren in einem wässrigen Ablationsmedium bestehend aus Natriumphosphatpuffer, Natriumchlorid oder Natronlauge durchgeführt. Die Einstellungen des Lasers sind in Tabelle 13 aufgeführt.

Tabelle 13: Auflistung der Laser- und Scanparameter, welche bei der Laserablation von ligandenfreien Goldnanopartikeln in Flüssigkeiten verwendet wurden.

Parameter	Einstellung
Wellenlänge	1064 nm
Pulsdauer	10 ps
Maximale Pulsenergie	160 µJ
Repetitionsrate	100 kHz
Leistung hinter der F-Theta-Linse	11 W
Brennweite der F-Theta-Linse	100,1 mm
Arbeitsabstand	116 mm
Äußerer Spiraldurchmesser	6 mm
Scangeschwindigkeit	6 m/s

Die Funktionalisierung der Goldnanopartikel wurde mit monomodalen, monodispersen Partikeln durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden die Goldnanopartikel nach der Laserablation in 600 µM Natriumphosphatpuffer (pH 8,3) 13 Minuten bei 30.000 x g (8,9 mL, MLA-55 Rotor, Ultrazentrifuge *Optima Max-XP* von *Beckman Coulter*) zentrifugiert. Nach diesem Prozess lagen monomodale und monodisperse 5 nm Goldnanopartikel vor.

Eine zweite Methode zur Herstellung monomodaler, monodisperser Partikel ist die Fragmentierung. Hierbei wurde die Probe in einem 10 mL Probengefäß unter ständigem Rühren bei 532 nm mit einem Nanosekundenlaser (*Spitlight DPSS-250-100, Innolas*) bestrahlt. Hierbei wurden zunächst verschiedene Zeiten (20 min, 30 min, 40 min) und Energien (15 mJ, 33 mJ, 34 mJ, 38 mJ) untersucht. Die Fragmentierung wurde schließlich bei 15 mJ für 30 Minuten durchgeführt. Die Einstellungen des Lasers sind in Tabelle 14 aufgeführt.

Tabelle 14: Auflistung der Laser- und Scanparameter, welche bei der Fragmentierung bimodalen Goldnanopartikeln in Flüssigkeiten verwendet wurden.

Parameter	Einstellung
Wellenlänge	532 nm
Pulsdauer	7 – 9 ns
Pulsenergie	< 125 mJ
Repetitionsrate	100 Hz

7.2.2.Funktionalisierung von Goldnanopartikeln

7.2.2.1. Nanopartikel-Funktionalisierung mit Oligonukleotiden

Für die Funktionalisierung der lasergenerierten Goldnanopartikel wurden die monomodalen, monodispersen Partikel mit einer Endkonzentration von 30 µg/mL und 50 µg/mL eingesetzt. Hierbei wurde zunächst aus der Stammlösung das Goldkolloid vorgelegt, mit MilliQ-Wasser und anschließend mit der entsprechenden Menge an Oligonukleotid (DNA oder LNA) versetzt. Die gründliche Vermischung der Mixtur erfolgte mit einem Schüttler (Vortex). Weiterhin wurde fünfmal eine Natriumchlorid-Lösung in Abständen von 20 Minuten zu dem Nanopartikel-Oligonukleotid-Gemisch hinzugegeben. Die Konzentration der NaCl-Stammlösung betrug das 10-fache der gewünschten Endkonzentration, das hinzuzugebende Volumen betrug demnach jeweils 1/5 des gesamten Volumens an NaCl. Demzufolge wurden beispielsweise

100 µL einer 5 M NaCl-Lösung für die Konjugation von 1 mL Probenvolumen verwendet, um eine Endkonzentration von 0,5 M NaCl zu erreichen. Die Variation der Endkonzentration erfolgte in diesem Fall zwischen 0 M und 0,5 M Natriumchlorid. Die Konjugat-Lösung wurde mit einem Vortex-Schüttler gründlich vermischt und schließlich 24 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert und danach zur Abtrennung ungebundener Oligonukleotide 60 Minuten bei 100.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde zur Bestimmung der Partikel-Beladung mittels *UV-Vis-Spektrometrie* aufbewahrt. Das Pellet wurde mit MilliQ-Wasser redispergiert und zur weiteren Analyse und Verwendung ebenfalls aufbewahrt.

Die Endkonzentration der Oligonukleotide bei der Konjugation lag zwischen 0,3 µM und 8,0 µM und ist in Tabelle 15 zusammen mit den eingesetzten Verhältnissen der Oligonukleotide pro Goldnanopartikel aufgelistet. Außerdem ist das entsprechende Experiment aufgeführt, für welches die jeweiligen Zusammensetzungen eingesetzt wurden.

Tabelle 15: Auflistung der eingesetzten Goldnanopartikel-, Oligonukleotid- und Natriumchlorid-Konzentrationen und der eingesetzten Oligonukleotid-pro-AuNP-Verhältnisse.

Konzentration AuNP	Konzentration Oligonukleotid	Konzentration Salz	Oligonukleotid pro AuNP	Oligonukleotid
30 µg/mL	1,3/2,0/4,0/8,0 µM	0,01/0,025/0,05/0,1 /0,2/0,25/0,3/0,5 M NaCl	33/51/101/203	5'DNA _{TC26T10}
30 µg/mL	1,3 µM	0,05&0,1/0,2/0,3 M NaPP	33	5'DNA _{TC26T10}
30 µg/mL	1,3 µM	0/0,05/0,1/0,2/0,3/0,5 M	33	5'DNA _{TC28T10}
30 µg/mL	0,67/1,3/2,0/2,7/4,0/8,0 µM	0/0,05/0,1/0,2/0,25/0,3/0,5 M	17/33/51/69/101/203	5'DNA _{TC30T10}
30 µg/mL	0,67 µM	0/0,05/0,1/0,15/0,2/0,25/0,3/0,5 M	17	5'LNA10
30 µg/mL	1,3 µM	0/0,05/0,1/0,2/0,3/0,5 M	34	5'LNA22
30 µg/mL	0,3/0,67/1,3/2,67/4,0/5,3 µM	0,01/0,025/0,05/0,1/0,154/0,2/0,3/0,5 M	9/17/34/68/101/134	5'LNA30 _{T10}
30 µg/mL	0,67 µM	0,05/0,1/0,154/0,2/0,3/0,5 M	17	5'LNA36 _{T10}
50 µg/mL	0,67 µM	0,05/0,1/0,154/0,2/0,3/0,5 M	10	5'LNA36 _{T10}

7.2.2.2. Nanopartikel-Funktionalisierung mit Peptiden, anderen Thiol-Liganden oder Anionen

Bei der Funktionalisierung von Goldnanopartikeln mit Anionen, Peptiden und anderen Thiol-Liganden wie Liponsäure oder Dihydroliponsäure wurden die Konjugate mit einer finalen Goldkonzentration von 50 µg/mL hergestellt. In diesem Prozess wurde ebenfalls das Goldkolloid vorgelegt, mit einer entsprechenden Menge an MilliQ-Wasser und anschließend mit einer entsprechenden Menge an Liganden oder Anionen versetzt. Das Nanopartikel-Ligand-Gemisch wurde mit einem Vortex-Schüttler gründlich vermischt und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Entsprechend der folgenden Anwendung wurden die hergestellten Konjugate entweder mittels Ultrazentrifuge (60 min, 30.000 x g) aufgereinigt oder unmittelbar nach der Herstellung weiterverwendet. Die eingesetzten Konzentrationen und Ligand- bzw. Anion-zu-Nanopartikel-Verhältnisse sind in Tabelle 16 aufgelistet, ebenso wie die Angabe der entsprechenden Experimente.

Tabelle 16: Auflistung der eingesetzten Goldnanopartikel- und Thiol-Ligand- bzw. Anionen-Konzentrationen ebenso wie der eingesetzten Ligand-pro-AuNP- bzw. Anionen-pro-AuNP-Verhältnisse bezogen auf 50 µg/mL Goldnanopartikel.

Ligand bzw. Anion	Konzentration des Liganden/ Anions	Konzentration AuNP	Experiment
NaCl	0/0,009/0,045/0,06 75/0,09/0,225/0,45 /0,675/0,9/2,25/4,5 /9/18/36/54 mM	50 µg/mL	Ligandeneinfluss
Trinatriumcitrat	0/0,003/0,015/0,02 5/0,03/0,075/0,15/ 0,225/0,3/0,75/1,5/ 3/6/12/18 mM	50 µg/mL	Ligandeneinfluss
Natriumphosphat-puffer	6 mM	50 µg/mL	Ligandeneinfluss
Liponsäure	0/12,5/25/37,5/50/ 62,5/75/87,5/100/1 12,5/125/150/175/ 200 µM	75 µg/mL	Ligandeneinfluss
Dihydroliponsäure	0/12,5/25/37,5/50/ 62,5/75/87,5/100/1 12,5/125/150/175/ 200 µM	75 µg/mL	Ligandeneinfluss
SAP	2,0/6,0/8,0/13/15/1 9/30/40/50 µM	50 µg/mL	Ligandeneinfluss

Ligand bzw. Anion	Konzentration des Liganden/ Anions	Konzentration AuNP	Experiment
CE ₁₂ W	1,0/5,0/10/25/40/80/150 µM	50 µg/mL	Ligandeneinfluss Aufreinigung
NLS _{Cys}	0,1/0,2/0,3/0,4/0,5/0,6/0,7/0,8/0,9/1,0/2,0/3,0/4,0/5,0/8,0/11/14/17/20 µm	50 µg/mL	Ligandeneinfluss
	2,0 µM, 10,0 µM, 20,0 µM		Spermienpenetration Anwendung: TRegs Anwendung: ZMTH3
NLS	0,2/0,4/0,6/0,8/1,0/2,0/3,0/4,0/5,0 µM	50 µg/mL	Ligandeneinfluss
CWR ₁₀	2,0 µM, 3,3 µM, 10,0 µM,	50 µg/mL	Ligandeneinfluss Anwendung: ZMTH3
CWKLPVM	2,0 µM, 2,5 µM, 10,0 µM	50 µg/mL	Ligandeneinfluss Spermienpenetration
DB-Tat	1,9 µM, 25,7 µM	50 µg/mL	Spermienpenetration
Bovine Serum Albumin (BSA)	2,5 g/L	50 µg/mL	Anwendung: TRegs Anwendung: ZMTH3
Spermin	3,3 µM, 19,6 µM	50 µg/mL	Spermienpenetration
SDS	20,0 µM	50 µg/mL	Spermienpenetration
CTAB	20,0 µM, 16,6 µM	50 µg/mL	Spermienpenetration
Polyethylenglycol (PEG ₄₀₀)	0,45 µM	50 µg/mL	Spermienpenetration
Polyvinylpyrrolidon (PVP)	0,01 µM	50 µg/mL	Spermienpenetration

7.2.3. Vorbereitung der Proben zur Charakterisierung der Goldnanopartikel-Konjugate

7.2.3.1. Herstellung der Pufferlösungen

Ein Natriumphosphatpuffer wurde sowohl für die Nanopartikelherstellung als auch für weitergehende Experimente verwendet. Dieser Puffer wurde zunächst als 10 mM Stammlösung mit einem pH-Wert von 9 hergestellt. Hierzu wurden 0,6107 g (141,96 g/mol) Dinatriumhydrogenphosphat und 0,0963 g (137,99 g/mol) Natriumdihydrogenphosphat-H₂O in 500 mL MilliQ-Wasser gelöst. Der pH-Wert wurde anschließend mit Salzsäure (HCl) und Natronlauge (NaOH) angepasst. Für die entsprechenden Experimente wurde der Puffer auf die benötigten Konzentrationen (Tabelle 16) verdünnt. Hierbei ist zu beachten, dass die Pufferwirkung bei Verdünnungen nachlässt.

In den Stabilitätstests und biologischen Experimenten wurden die Puffer PBS und TRIS verwendet. Für die Herstellung des TRIS-Puffers in einfacher Konzentration wurde eine wässrige Lösung aus 199,98 mM Tris(hydroxymethyl)-aminomethan, 64,72 mM Zitronensäure-Monohydrat, 95,5 mM D-Fructose und 50 mg/L Gentamicinsulfat hergestellt. Anschließend wurde mittels HCl und NaOH der pH-Wert auf 6,8 eingestellt. Eine Stammlösung PBS-Puffer in 10-facher Konzentration wurde durch das Lösen von 5,5 g PBS-Pulver (Zusammensetzung in Tabelle 17) in 10 mL MilliQ-Wasser und anschließender pH-Wert-Einstellung mittels HCl und NaOH hergestellt.

Tabelle 17: Zusammensetzung des PBS-Puffers in einfacher Konzentration.

Substanz	Konzentration
Natriumchlorid	136,9 mM
Kaliumchlorid	2,7 mM
Dinatriumhydrogenphosphat	10,0 mM
Kaliumdihydrogenphosphat	2,0 mM
NaOH/HCl	pH-Wert-Anpassung an pH 7,4

7.2.3.2. Stabilitätsuntersuchungen in biologischen Puffern

Für die Stabilitätsuntersuchung der Goldnanopartikel-Konjugate in biologischen Puffern wie TRIS, PBS oder PBS mit MgCl_2 wurden die Puffer-Lösungen in doppelter Konzentration angesetzt. Anschließend wurden die Goldnanopartikel-Konjugate in einem Verhältnis von 1:1 in das Puffermedium überführt. Für den Puffer, welcher aus PBS und MgCl_2 besteht, wurden die Konjugate zunächst mit PBS vermischt. Das Magnesiumchlorid wurde anschließend als 100 mM Lösung (= 9,52 g/L) in 10 Schritten je 10 μL , dessen Abstände 15 Minuten betrug, zu der Puffer-Konjugat-Lösung gegeben, so dass eine Endkonzentration von 10 mM MgCl_2 erhalten wurde. Die Lagerung der Konjugate erfolgte bei 4°C im Kühlschrank.

7.2.3.3. Probenpräparation zur TEM-Analyse

Bei der Probenpräparation zur Analyse der Proben mittels TEM muss zwischen wässrigen und biologischen Proben unterschieden werden. Bei wässrigen Proben wurden ca. 5 μL der Probe auf ein mit Kohlenstoff beschichtetes Kupfer-Grid getropft und bei Raumtemperatur getrocknet. Die Präparation von biologischen Proben ist aufwendiger und wird in Kapitel 7.2.4.2 ausführlich beschrieben.

7.2.4. Biologische Assays

7.2.4.1. Durchführung der Analyse der

Hybridisierungseigenschaften von Goldnanopartikel-LNA-Konjugaten

Synthetische DNA

Die Analyse der Hybridisierungseigenschaften von LNA-Molekülen, welche an Nanopartikel gekoppelt sind, an synthetische doppelsträngige DNA (dsDNA) wurde mittels temperaturabhängiger *UV-Vis-Spektroskopie*, auch *Schmelzkurvenanalyse* genannt, durchgeführt.

Hierzu wurde die doppelsträngige DNA mit AuNP-LNA-Konjugaten in einem DNA-zu-LNA-Verhältnis von mindestens 1:1 in einfach konzentrierten PBS-Puffer versetzt. Die Endkonzentration der LNA betrug hierbei 0,005 – 0,19 μM und die Endkonzentration

der Goldnanopartikel lag zwischen 0,4 – 28,6 µg/mL. Die Herstellung der dsDNA⁶³ erfolgte durch das Mischen von jeweils 100 pmol/µL der zueinander komplementären einzelsträngigen DNA in destilliertem Wasser. Die Mischung wurde für 10 Minuten auf 95°C erhitzt und anschließend ohne äußere Einflüsse auf Raumtemperatur abgekühlt, um eine möglichst vollständige Bindung der Basenpaare im Doppelstrang zu gewährleisten.

Die *Schmelzkurvenanalyse* wurde mit einem UV-Vis-Spektrometer *Evolution 201* (Thermo Scientific) durchgeführt. Die Temperierung der Proben erfolgte über ein Heizgerät (*Unistat tango, Huber*) und einen thermostatisierten Küvettenwechsler in einem Temperaturbereich zwischen 15°C und 90°C. Das Temperaturprogramm bestand aus einem Abwechseln zwischen Erhöhung (2 min) und Halten (12 min) der Temperatur und wurde innerhalb einer Messung sowohl vorwärts als auch rückwärts durchgeführt. Dieser Zyklus wurde einmal pro Messung durchgeführt. Die UV-Vis-Messung erfolgte jeweils in der Halte-Phase des Programms. Für die Auswertung der Hybridisierungseigenschaften wurde schließlich der Extinktionswert bei 260 nm verwendet.

Genomische DNA und demembranierte Spermienköpfe

Bei der Untersuchung der Hybridisierungseigenschaften der AuNP-LNA-Konjugate an biologischen Proben sind zum einen genomische DNA (gDNA) und zum anderen demembranierte Spermienköpfe untersucht worden. Es wurden Verhältnisse an AuNP-LNA-Konjugat zu gDNA zwischen 0,6 und 40 µg AuNP pro 1 µg gDNA untersucht. Hierbei wurde außerdem die Goldkonzentration in einem Bereich zwischen 1 µg/mL und 40 µg/mL variiert. Im Falle der demembranierten Spermienköpfe lagen die Verhältnisse zwischen 6,4 und 80 pg AuNP/Spermienkopf.

Bei der Hybridisierung sowohl mit genomischer DNA als auch mit demembranierten Spermienköpfen wurden die Proben in einfach konzentriertem PBS mit 10 mM MgCl₂ bei einem pH-Wert von 7 hergestellt, wobei das Magnesiumchlorid erst nach der Überführung der Konjugate und der biologischen Komponenten in den Puffer schrittweise (10 Mal in Abständen von 15 Minuten) hinzugefügt wurde. Anschließend

⁶³ Die eingesetzte dsDNA wurde von Dr. Roberto Mancini im Rahmen des DFG-Kooperationsprojektes am Institut für Nutztiergenetik des Friedrich-Loeffler-Instituts (Mariensee) unter der Leitung von Prof. Dr. Detlef Rath hergestellt und für diese Messungen zur Verfügung gestellt.

erfolgte die Inkubation der Proben mit den demembraniserten Spermienköpfen bei 37°C und mit der genomischen DNA bei 19°C für jeweils eine Stunde.

Die Untersuchung der Proben erfolgte mit Hilfe von verschiedenen Analysemethoden wie der UV-Vis-Spektroskopie zur Detektion einer Verschiebung des SPR-Peaks aufgrund einer Plasmonenkopplung der Partikel und der erhöhten Streuung der Partikel nach Hybridisierung. Weitere Methoden sind die Konfokalmikroskopie zur bildlichen Darstellung einer Partikelakkumulation und die Dynamische Lichtstreuung zur Bestimmung der Größe und des Zetapotentials.

7.2.4.2. Experimente zur Analyse der Penetrationseigenschaften von Goldnanopartikel-Konjugaten

Die im Folgenden beschriebenen Experimente wurden in Zusammenarbeit mit sowohl externen als auch internen Kooperationspartnern durchgeführt. Mit dem Institut für Nutztiergenetik des Friedrich-Loeffler-Instituts in Mariensee wurden die Experimente mit Bullenspermien durchgeführt. Die Versuche mit regulatorischen T-Zellen erfolgten in Zusammenarbeit mit dem Institut für Mikrobiologie des Universitätsklinikums Essen. Die laserinduzierte Freisetzung von Goldnanopartikeln in Krebszellen erfolgte gemeinsam mit dem Institut für Angewandte Optik der Friedrich-Schiller-Universität Jena. Eine detaillierte Auflistung aller an den Experimenten beteiligten Personen ist in Kapitel 7.1.3 und den entsprechenden Kapiteln der Ergebnisdarstellung aufgeführt.

Vorbereitung der Zellen und Durchführung der Zellexperimente

Die ejakulierten Bullenspermien wurden zunächst zweimal 10 Minuten bei 200 x g zentrifugiert und jeweils in TRIS-Puffer (Kapitel 7.2.3) wieder aufgenommen. Die gewaschenen Spermien wurden anschließend mit verschiedenen Goldnanopartikel-Konjugaten zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Die Anzahlkonzentration der Spermien betrug $100 \cdot 10^6$ Spermien pro Milliliter, während die Konzentration der Nanopartikel bei 10 µg/mL lag. Abweichende Konzentrationen werden an den entsprechenden Stellen erwähnt. Nach der Inkubation wurden die Spermien ein weiteres Mal durch Zentrifugation gewaschen, um nicht gebundene Partikel zu entfernen.

Im weiteren Verlauf wurden auch Milzzellen der BALB/c-Maus verwendet. Hierbei wurden Experimente sowohl mit allen Milzzellen als auch nur mit regulatorischen T-Zellen durchgeführt. Die Gesamtmenge der Milzzellen wurde durch Spülen mit Erythrozyten-Lyse-Puffer und PBS, welches mit 2% FCS und 2 mM EDTA versetzt war, aus der Milz gewonnen. Die regulatorischen und nicht regulatorischen T-Zellen wurden anschließend mit Hilfe eines Isolierungs-Kits (MACS⁶⁴) von den übrigen Milzzellen getrennt.

Bei den Experimenten zur Nanopartikel-Aufnahme mit der Gesamtmenge der Milzzellen wurden die Zellen in Zellkulturmedium (IMDM⁶⁵ mit 10% FCS, 25 μ M β -Mercaptoethanol und 100 U/mL Penizillin/Streptomycin) bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Die Goldnanopartikel-Konjugate wurden in verschiedenen Konzentrationen zu den Zellen gegeben, sodass eine Endkonzentration von 0 - $8 \cdot 10^6$ Nanopartikel pro Zelle erreicht wurden. Nach vier Stunden Inkubation wurden die Zellen mit der PBS-Lösung zwei Mal gewaschen.

Die Analyse der Nanopartikel-Konjugate, welche in die verschiedenen Zellen aufgenommen wurden, erfolgte mittels FACS-Messung. Zu diesem Zweck waren die Liganden der Konjugate mit dem Fluoreszenzfarbstoff Alexa488 markiert. Die Zellen wurden nach der Inkubation mit eFluor780 als Marker für tote Zellen sowie mit fluorophormarkierten Antikörpern für die verschiedenen Zelltypen (CD4, CD25, CD8, CD19, CD11b, CD11c) bei 4°C für 10 Minuten gefärbt.

Für die Untersuchung mittels Konfokalmikroskopie wurden die regulatorischen und nicht regulatorischen T-Zellen eingesetzt. Hier wurden $1,6 \cdot 10^6$ Goldnanopartikel pro Zelle für zwei Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in PBS gewaschen und mit 2%-igem Paraformaldehyd für 15 Minuten fixiert, erneut gewaschen und mit Roti®Mount Fluor Care versetzt.

Der Nachweis eines funktionalen Konjugats wurde durch das Herabregulieren der eGFP-Expression in den regulatorischen T-Zellen erreicht. Hierbei wurden regulatorische T-Zellen der Foxp3/eGFP Reporter-Maus verwendet und mit Goldnanopartikel-Konjugaten, welche zusätzlich mit einer siRNA versehen waren, inkubiert. Es wurde eine Nanopartikel-Dosis von $1,6 \cdot 10^6$ und $3,2 \cdot 10^6$ Nanopartikeln pro

⁶⁴ MACS ist eine Methode, mit der die Isolierung von Zellen auf Basis magnetisch erfolgt. Die Abkürzung ist in Kapitel 7.3 aufgeführt.

⁶⁵ IMDM ist ein spezielles Zellkulturmedium, welches in biologischen Experimenten eingesetzt wird. Die Abkürzung ist in Kapitel 7.3 aufgeführt.

Zelle eingesetzt. Die Inkubationszeit betrug in diesem Experiment zwei und drei Tage. Für die Analyse mittels FACS wurde auch hier eine Färbung der toten Zellen mit eFlour 780 vorgenommen.

Für die laserinduzierte Freisetzung von Goldnanopartikeln in Zellen wurden canine ZMTH3-Zellen aus einem spontan auftretenden Mammakarzinom eingesetzt. Die Zellen wurden einen Tag vor der Durchführung der Experimente ausgesät. Sie wurden in Zellkulturmedium (RPMI-1640⁶⁶, 10% FCS, 1% Penizillin/Streptomycin) kultiviert und mit Goldnanopartikel-Peptid-Konjugaten bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Hierbei lag die Nanopartikelkonzentration bei 1,23 µg/mL, 2,45 µg/mL oder 4,92 µg/mL und die Inkubationsdauer wurde zwischen 0,5 – 24 Stunden variiert. Anschließend wurden die Zellen zwei Mal mit PBS gewaschen und frisches Medium wurde hinzu gegeben. Die Zellen wurden mit einem gepulsten Nanosekundenlaser (Pulsdauer: 1 ns) bei einer Wellenlänge von 532 nm und einer Repetitionsrate von 22,5 kHz bestrahlt. Hierbei wurden Fluenzen zwischen 0 – 35 mJ/cm² variiert.

Für die Untersuchung der *Nanopartikelaufnahme* wurden die Zellen nach der Inkubation mit 0,5 µg/mL CellMask Orange für eine Dauer von 5 Minuten angefärbt. Hiernach erfolgte zweifaches Waschen mit PBS sowie die Hinzugabe von frischem Medium. Der Anteil toter Zellen wurde mittels PI-Färbung (75 µM) bestimmt. Die Menge an aufgenommenen Nanopartikeln wurde über die mittlere Fläche der Nanopartikel pro Zelle bestimmt. Hierbei wurde zunächst die Fläche der Zelle über die Membranfärbung mit CellMask Orange als ROI bestimmt. Für die Ermittlung der Fläche an Nanopartikeln wurde der Hintergrund, welcher der mittlere Grauwert des ausgewählten Bereiches in der Umgebung jeder Zelle ist, von den Fluoreszenzintensitätswerten abgezogen. Nach dem Umwandeln der ROIs in binäre Bilder, kann der Anteil der Pixel, welcher von den fluoreszierenden Bereichen der Nanopartikel stammt, berechnet werden.

Ferner wurde die *Freisetzung* in den Zellen untersucht. Hierbei wurde der zellimpermeable Farbstoff Calcein zu dem Zellkulturmedium gegeben. Die Inkubationsdauer betrug in diesem Fall vier Stunden. Die Viabilität der Zellen wurde durch eine Doppelfärbung mit Propidiumiodid (2,5 µM) und Calcein AM (3 µM)

⁶⁶ RPMI-1640 ist ein spezielles Zellkulturmedium, welches in biologischen Experimenten eingesetzt wird. Die Abkürzung ist in Kapitel 7.3 aufgeführt.

ermittelt. Ein Langzeit-Einfluss der Bestrahlung wurde über die metabolische Aktivität der Zellen mit Hilfe des Farbstoffs PrestoBlue überprüft. Zu diesem Zweck wurden 10% des Farbstoffes in das Zellkulturmedium gegeben und 24 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

Vorbereitung der Proben zur mikroskopischen Analyse

Die Analyse der Penetrationsfähigkeit der Konjugate in Bullenspermien und regulatorische T-Zellen erfolgte mikroskopisch anhand der konfokalen Mikroskopie. Für die Untersuchung wurde zunächst ein Lochverstärkerring auf einen Objektträger geklebt und glatt gestrichen, sodass die Ränder fest auf dem Objektträger lagen. Anschließend wurden ca. 5 µL der Zell-Nanopartikel-Suspension in die Mitte des Lochverstärkerrings getropft und mit einem Deckglas abgedeckt, welches mit Nagellack abgedichtet wurde. In einzelnen Experimenten wurde außerdem eine Tod-Färbung der Spermien mit Propidiumiodid (PI) durchgeführt. Hierbei wurde lediglich vor der Präparation 1 µL einer 24 nM PI-Lösung zu den Spermien (~50 µL) gegeben und vermischt.

Probenpräparation zur TEM-Analyse

Nach der Inkubation der Zellen mit Nanopartikel-Konjugaten wurden die Zellen fixiert. Für die Spermien wurde dafür eine Lösung aus 1,5% Glutaraldehyd und 1,5% Paraformaldehyd in 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,5) verwendet. Für die Milzzellen und Krebszellen hingegen wurde jeweils 2,5%-iges Glutaraldehyd in PBS verwendet. Die Fixierungsdauer betrug dabei eine Stunde bei Raumtemperatur. Die Spermien hingegen wurden über Nacht fixiert. Nach der Fixierung wurden die Zellen gewaschen und, im Fall der Spermien, in Agarose überführt. Hierzu wurden die Zellen nach einem zweiten Zentrifugationsschritt in dem zentrifugierten Pellet vorsichtig in Lösung gebracht und anschließend in einem 1:1-Verhältnis mit 2%-iger Agarose vermischt. Die Probe wurde ein weiteres Mal zentrifugiert und anschließend bei 4°C ausgehärtet. Sie wurde aus der gehärteten Agarose geschnitten und nach einem Waschschrift mit Phosphatpuffer mit 1%-igem Osmiumtetroxid angefärbt. Die Milz- und Krebszellen wurden nicht in Agarose überführt, jedoch auch mit 1% Osmiumtetroxid angefärbt.

Anschließend wurden die fixierten Spermien und T-Zellen in PBS und die Krebszellen zusätzlich in Kakodylatpuffer gewaschen. Es folgte eine Dehydrierung der Zellen mit ansteigender Ethanol-Konzentration und die Einbettung in Epon. Mit Hilfe eines Ultramikrotoms wurden ca. 70 nm Ultradünnschnitte aus dem Probenblock geschnitten und auf ein Kupfer-Grid gelegt. Schließlich wurden die Proben mit Uranylacetat und Bleicitrat angefärbt.

7.3. Abkürzungsverzeichnis

Die Abkürzungen, welche in dieser Arbeit verwendet wurden, sind in Tabelle 18 aufgelistet.

Tabelle 18: Auflistung der verwendeten Abkürzungen.

Abkürzung	Bedeutung
Alexa488	AlexaFluor488
ASZ	Analytische Scheibenzentrifuge
AuNP	Goldnanopartikel
AuNC	Goldnanocluster
AUZ	Analytische Ultrazentrifuge
CPP	Zellpenetrierendes Peptid (engl: cell penetrating peptdide)
DLS	Dynamische Lichtstreuung
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl.: desoxyribonucleic acid)
dsDNA	Doppelsträngige DNA
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FACS	Fluoreszenzaktivierte Zellsortierung (engl.: fluorescence activated cell sorting)
FCS	Fetales Kälberserum (engl.: fetal calf serum)
FLIM	Fluoreszenzlebensdauermessung (engl.: Fluorescence Imaging Measurement)
gDNA	Genomische DNA
GE	Gel-Elektrophorese
HyD	Hybriddetektor (engl.: hybrid detector)
IEP	Isoelektrischer Punkt
IMDM	Dulbeccos Medium (engl.: Iscove's Modified Dulbecco's Media)
LNA	Locked Nucleic Acid
MACS	Methode zur magnetischen Isolierung von Zellen; engl.: magnetic Cell Isolations and Cell Separation
NaPP	Natriumphosphatpuffer
NC	Nettoladung (engl.: net charge)
NIR	Nahes Infrarot
PLAL	Gepulste Laserablation in Flüssigkeiten (engl.: pulsed laser ablation in liquid)
PMT	Photoelektronenvervielfacher (engl.: photomultiplier tube)
PMT Trans	Option des PMT für Transmissionsaufnahmen

Abkürzung	Bedeutung
PPI	Primärpartikelindex
RC	Regenerierte Zellulose
RPMI-1640	Zellkulturmedium, welches auf einem Hydrogencarbonat-Puffer basiert und von einem Forscherteam am <u>R</u> oswell <u>P</u> ark <u>M</u> emorial <u>I</u> nstitute (Buffalo, USA) entwickelt wurde
RT	Raumtemperatur
SPR	Oberflächenplasmonenresonanz (engl.: surface plasmon resonance)
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
UV-Vis	Ultraviolett, sichtbar (engl.: Ultraviolett-Visible)
UZ	Ultrazentrifuge, Ultrazentrifugation

7.4. Variablen

Die Variablen, welche in dieser Arbeit verwendet wurden, sind in Tabelle 19 aufgelistet.

Tabelle 19: Auflistung der verwendeten Variablen.

Variable	Bedeutung
λ	Wellenlänge
κ	Debye-Parameter
κ^{-1}	Debye-Länge
K	Footprint
r	Partikelradius
N_r	mittlere Anzahl an Liganden pro Nanopartikel

7.5. Formelverzeichnis

Formel 1: Primärpartikelindex PPI.....	12
Formel 2: Smoluchowski-Bereich.....	18
Formel 3: Hückel-Bereich.....	18
Formel 4: Henry-Funktion.....	18
Formel 5: Footprint K.....	31

7.6. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der lokalisierten Oberflächenplasmonenresonanz. Adaptiert nach [65].	11
Abbildung 2: Darstellung der größenabhängigen Oberflächenplasmonenresonanz von Goldnanopartikeln. Adaptiert nach [66].	11
Abbildung 3: Darstellung der zeitlichen Abfolge der Prozesse bei der gepulsten Laserablation in Flüssigkeiten. Adaptiert nach [78].	14
Abbildung 4: Darstellung der Anziehungs- und Abstoßungskräfte als potentielle Energie in Abhängigkeit des Interpartikelabstandes zwischen zwei kolloidalen Partikeln. Adaptiert nach [92].	16
Abbildung 5: Darstellung des Prinzips der elektrochemischen Doppelschicht an der Oberfläche eines Partikels anhand des Helmholtz-Modells (A), des Gouy-Chapman-Modells (B) und des Gouy-Chapman-Stern-Modells (C). H beschreibt die Dicke der Doppelschicht im Helmholtz-Modell und die Dicke der Sternschicht. ψ beschreibt das Potential an der Oberfläche der Elektrode. Adaptiert nach [93]. Darstellung des Zusammenhangs zwischen der diffusen und der Sternschicht und dem Zetapotential. (D) Adaptiert nach [94].	17
Abbildung 6: Wachstumsmechanismus von Goldnanopartikeln für die Herstellung der Nanopartikel in mikromolar konzentrierten salzhaltigen Ablationsmedien. Adaptiert nach [73].	20
Abbildung 7: A) Darstellung der dreidimensionalen Doppelhelix-Struktur von DNA. Adaptiert nach [131]; B) Strukturelle Darstellung der Nukleotide von DNA und LNA. Adaptiert nach [132].	25
Abbildung 8: Darstellung eines Triplex: A) Darstellung einer Doppelhelix, an die eine LNA hybridisiert und einen Triplex formt. Adaptiert nach [137]. B und C) Darstellung der Bindungen zwischen den Basenpaaren in einem Triplex für die Basenpaarung C:G:C und T:A:T. Adaptiert nach [139].	26
Abbildung 9: Darstellung der Oberflächenbedeckung auf unterschiedlich große Nanopartikel und einer planaren Oberfläche. Adaptiert nach [157].	31
Abbildung 10: Darstellung der Zusammenhänge des Prinzips des Ladungsausgleiches bei der Funktionalisierung von negativ geladenen Goldnanopartikeln mit positiv geladenen Liganden. NC bedeutet hier Nettoladung (engl.: Net-Charge). Adaptiert nach [72].	33

Abbildung 11: Übersicht der durchgeführten Experimente, welche in dem Kapitel „Ergebnisse und Diskussion“ beschrieben und diskutiert werden.....	38
Abbildung 12: Größeneinstellung von Goldnanopartikeln. Relative (A) und Kumulative (B) Oberflächenverteilungen der Goldnanopartikel hergestellt in verschiedenen Abtragsmedien.	40
Abbildung 13: Größeneinstellung von Goldnanopartikeln. Vergleich der Rohabträge mit den ultrazentrifugierten und fragmentierten Proben. Kumulative Oberflächenverteilungen der Goldnanopartikel, welche in 600 μ M Natriumphosphatpuffer (A) und 100 μ M Natriumchlorid (B) hergestellt wurden. Darstellung des mittleren Partikeldurchmessers von Goldnanopartikel, welche in 600 μ M Natriumphosphatpuffer und 100 μ M Natriumchlorid hergestellt wurden. (C); Darstellung der prozentualen Oberflächenmenge größer und kleiner 10 nm in einem Kolloid der genannten Proben. (D)	42
Abbildung 14: Primärpartikelindex und Lage des SPR-Peaks der in 600 μ M Natriumphosphatpuffer und 100 μ M Natriumchlorid hergestellten Goldnanopartikel. Es werden die Daten der Rohabträge, der ultrazentrifugierten und fragmentierten Proben verglichen.	44
Abbildung 15: Titrationskurve zur Ermittlung des isoelektrischen Punktes von bimodalen und monomodalen Goldnanopartikeln. (A); Titrationskurve der beiden Goldnanopartikel-Kolloiden mit Salzsäure und Natronlauge zur Ermittlung eines Puffereffektes der Nanopartikel. (B)	45
Abbildung 16: Langzeitstabilität der bimodalen und monomodalen Goldnanopartikel, welche in 600 μ M Natriumphosphatpuffer hergestellt wurden, über einen Zeitraum von 13,5 Monate: Darstellung des Primärpartikelindex (A), des Zetapotentials (B), der Verschiebung des SPR-Peaks (C) und des hydrodynamischen Partikeldurchmessers aus der Anzahlverteilung (D).	48
Abbildung 17: Einfluss von Natriumchlorid, Natriumphosphatpuffer und Trinatriumcitrat auf Goldnanopartikel. Darstellung des Primärpartikelindex (A, B) und der Verschiebung des SPR-Peaks in Abhängigkeit der Ladung pro Nanopartikel und des pH-Wertes. Die Ionenstärken der Salze betragen 0 – 54 mM NaCl, 0 – 108 mM Trinatriumcitrat und 8,6 - 17,2 mM NaPP.	51
Abbildung 18: Abhängigkeit des Zetapotentials von der Ladung pro Nanopartikel (A) und dem pH-Wert (B) für Natriumchlorid, Natriumphosphatpuffer und Trinatriumcitrat	

auf Goldnanopartikel. Die Ionenstärken der Salze betragen 0 – 54 mM NaCl, 0 – 108 mM Trinatriumcitrat und 8,6 - 17,2 mM NaPP.	52
Abbildung 19: Strukturformeln von Liponsäure und Dihydroliponsäure.	57
Abbildung 20: Einfluss der Disulfid- und Dithiol-Gruppen auf das Goldnanopartikel-Konjugat. Darstellung des Primärpartikelindex (A, C) und der Verschiebung des SPR-Peaks (B, D) von Liponsäure und Dihydroliponsäure in Abhängigkeit der Anzahl an Liganden pro Nanopartikel nach der Konjugation und nach der Aufreinigung der Konjugate.	58
Abbildung 21: Darstellung des hydrodynamischen Partikeldurchmessers (Anzahlverteilung) abhängig von der eingesetzten Anzahl der Liganden pro Nanopartikel von Konjugaten mit Liponsäure und Dihydroliponsäure nach der Aufreinigung mittels Ultrazentrifugation. Der rote Bereich kennzeichnet die Größe der monomodalen Goldnanopartikel, welche zur Konjugation verwendet wurden.....	60
Abbildung 22: Titrationskurve zur Ermittlung des isoelektrischen Punktes anhand des Zetapotential in Abhängigkeit des pH-Wertes (A) und Darstellung des Anteils der Oberflächenatome unterschiedlicher Oxidationszustände von Goldnanopartikeln funktionalisiert mit Liponsäure und Dihydroliponsäure (B).....	62
Abbildung 23: Stabilität von AuNP-NLS-Konjugaten unter Verwendung des Peptids mit und ohne thiolbindender Cystein-Endgruppe. Normierter Primärpartikelindex (A, B) und Verschiebung des SPR-Peaks (C, D) der Konjugate in Abhängigkeit der eingesetzten Anzahl an Liganden pro Goldnanopartikel nach der Konjugation (A, C) in einem Bereich der Ligandendosis bis zu 90 Liganden/NP. Ein Vergleich der Proben nach der Konjugation und nach der Aufreinigung ist in einem kleineren Bereich der Ligandendosis bis zu 14 Liganden/NP dargestellt (B, D).....	66
Abbildung 24: Darstellung des normierten Primärpartikelindex (A) und der Verschiebung des SPR-Peaks (B) von Konjugaten mit verschiedenen Peptiden in Abhängigkeit der eingesetzten Anzahl an Liganden pro Nanopartikel.....	68
Abbildung 25: Darstellung des Hydrodynamischen Partikeldurchmessers (A) und des Zetapotentials (B) von Konjugaten mit verschiedenen Peptiden in Abhängigkeit der eingesetzten Anzahl an Liganden pro Nanopartikel.	69
Abbildung 26: Eigenschaften von AuNP-CE ₁₂ W-Konjugaten: Primärpartikelindex (links) und Verschiebung des SPR-Peaks (rechts).....	74
Abbildung 27: Stabilität der Konjugate bei der Zentrifugalfiltration. Primärpartikelindex PPI der AuNP-CE ₁₂ W-Konjugate vor und nach der Aufreinigung bei verschiedenen	

Zentrifugationszeiten von 20 min, 30 min, 40 min, 50 min und 60 min mit einer Geschwindigkeit von 3000 RPM (664 x g) (A) und 4000 RPM (1180 x g) (B).	75
Abbildung 28: Oberflächenbelegung der Goldnanopartikel an CE ₁₂ W mit unterschiedlichen Initialkonzentrationen von 0 bis 1922 Peptiden pro Nanopartikel, berechnet nach 20 min (A, D), 40 min (B, E) und 60 min (C, F) Zentrifugation bei 3000 RPM (664 x g) (A, B, C) und 4000 RPM (1180 x g) (D, E, F).	76
Abbildung 29: Darstellung der Anteile an CE ₁₂ W-Liganden, welche sich noch in der Probe befinden, mit einer Initialkonzentration von 14, 332 und 1055 Peptiden pro Goldnanopartikel in Abhängigkeit der Zentrifugationsdauer für 3000 RPM (664 x g) (A) und 4000 RPM (1180 x g) (B) nach jeweils drei Reinigungsschritten.	77
Abbildung 30: Anzahl der Liganden pro Nanopartikel in der Probe nach sechsmaliger Zentrifugation bei 3000 RPM (664 x g) (A) und 4000 RPM (1180 x g) (B) bei verschiedenen Zentrifugationsdauern.	78
Abbildung 31: Darstellung der theoretisch ermittelten Sättigungsbeladung (A) und der Sättigungseffizienz (B) für verschiedene Geschwindigkeiten (3000 RPM (664 x g); 4000 RPM (1180 x g)) in Abhängigkeit der Zentrifugationsdauer.	80
Abbildung 32: Aufreinigung von AuNP-CE ₁₂ W-Konjugaten mittels Ultrazentrifugation. Darstellung der gebundenen Anzahl an Liganden pro Nanopartikel (A) und des prozentualen Anteils anwesender Liganden (B) in Abhängigkeit der Reinigungsschritte unter Verwendung von verschiedenen Anfangskonzentrationen.	82
Abbildung 33: Darstellung der maximalen Oberflächenbelegung (links) und Konjugationseffizienz (rechts) abhängig von der eingesetzten Menge an Liganden pro Nanopartikel.	84
Abbildung 34: Verbliebene Goldkonzentration (A) und die Verschiebung des SPR-Peaks (B) von Konjugaten, welche mit verschiedenen Peptiden synthetisiert wurden, nach der Aufreinigung mittels Ultrazentrifugation.	87
Abbildung 35: Oberflächenbelegung der AuNP-5'LNA30T10-Konjugate. Darstellung der Liganden/AuNP in Abhängigkeit der Natriumchlorid-Konzentration (0 – 0,5 mol/L) und der Inkubationsdauer (24 – 168 h) nach der Aufreinigung mittels Ultrazentrifugation. (A) Darstellung der maximalen Oberflächenbelegung (links) und der Konjugationseffizienz (rechts) von 5'LNA30T ₁₀ auf lasergenerierte Goldnanopartikel in Abhängigkeit der Inkubationsdauer. (B) Die eingesetzte Oligonukleotid-Konzentration beträgt 1,3 µM.	90

Abbildung 36: Stabilität der AuNP-5'LNA _{30T10} -Konjugate dargestellt als Primärpartikelindex (A, B, C) und Position des SPR-Peaks (C, D, E) in Abhängigkeit der Natriumchlorid-Konzentration (0 – 0,5 mol/L) und der Inkubationsdauer (24 – 168 h) nach der Konjugation (A und D) und nach der Aufreinigung mittels Ultrazentrifugation (B und E). Für 0,3 M NaCl ist ein Auszug des PPI in Abhängigkeit der Inkubationsdauer vor und nach der Aufreinigung dargestellt. (C, F) Die eingesetzte Oligonukleotid-Konzentration beträgt 1,3 µM.	91
Abbildung 37: Stabilität der AuNP-Oligonukleotid-Konjugate. Darstellung des Primärpartikelindex (A, B, C) und der Position des SPR-Peaks (D, E, F) für Konjugate aus 5'DNA _{CT26T10} (1,3 µM) in Abhängigkeit der NaCl- und NaPP-Konzentration vor und nach der Aufreinigung mittels Ultrazentrifugation. Für 0,3 M NaCl und NaPP ist ein Auszug des PPI und der Position des SPR-Peaks in Abhängigkeit der Redispergier-Lösung aufgetragen. (C, F) Die eingesetzte Oligonukleotid-Konzentration beträgt 1,3 µM.	93
Abbildung 38: Oberflächenbedeckung der AuNP-Oligonukleotid-Konjugate. Darstellung der Anzahl gebundener Liganden pro Goldnanopartikel (links, Balken) und der Konjugationseffizienz (rechts, Punkte) für Konjugate mit 5'DNA _{CT26T10} (1,3 µM) in Abhängigkeit der NaCl- und NaPP-Konzentration nach der Aufreinigung mittels Ultrazentrifugation.	95
Abbildung 39: Oberflächenbedeckung der AuNP-Oligonukleotid-Konjugate. Darstellung der Anzahl gebundener Liganden pro Goldnanopartikel (A) und der Konjugationseffizienz (B) für Konjugate aus 5'DNA _{CT26T10} in Abhängigkeit der eingesetzten Menge an Liganden pro AuNP nach der Aufreinigung mittels Ultrazentrifugation für NaCl-Konzentrationen zwischen 0,01 und 0,5 mol/L.	98
Abbildung 40: Vergleich von LNA und DNA-Liganden bei der Funktionalisierung von Goldnanopartikeln. Darstellung der Anzahl gebundener Liganden pro Goldnanopartikel für LNA-Oligonukleotide (A) und DNA-Oligonukleotide (B) unterschiedlicher Länge in Abhängigkeit der eingesetzten Menge an NaCl. Die LNA-Konjugate wurden hierbei mit 0,7 µM LNA hergestellt, die DNA-Konjugate wurden hingegen mit 1,3 µM hergestellt.	100
Abbildung 41: Vergleich von LNA- und DNA-Liganden bei der Funktionalisierung von Goldnanopartikeln. Darstellung der maximalen Ligandenbelegung in Abhängigkeit der Anzahl an Basen. Die LNA-Konjugate wurden hierbei mit 0,7 µM LNA hergestellt, die DNA-Konjugate wurden hingegen mit 1,3 µM hergestellt. (A) Darstellung der	

Oberflächenbelegung (links, Balken) und der Konjugationseffizienz (rechts, Punkte) von DNA- und LNA-Konjugaten mit einer Sequenzlänge von 30 Basen in Abhängigkeit der eingesetzten Menge an NaCl. (B)	101
Abbildung 42: Oberflächenbelegung von bifunktionalen Konjugaten. Darstellung der Ligandenbelegung an Oligonukleotid und NLS _{Cys} -Peptid in Abhängigkeit der Anzahl an Basenpaaren für bifunktionale AuNP-Oligonukleotid-NLS _{Cys} -Konjugate. (A) Darstellung der Konjugationseffizienz von Oligonukleotiden und NLS _{Cys} -Peptid in Abhängigkeit der Anzahl an Basenpaaren für bifunktionale AuNP-Oligonukleotid-NLS _{Cys} -Konjugate. (B) Die Initialkonzentration der Oligonukleotide beträgt 0,7 µM und 1,3 µM. Bei dem NLS _{Cys} -Peptid wurde 2 µM eingesetzt.	105
Abbildung 43: Vergleich von monofunktionalen und bifunktionalen Konjugaten mittels Hydrodynamischer Partikeldurchmesser (A) und Zetapotential (B) in Abhängigkeit der bei der Oligonukleotid-Konjugation verwendeten NaCl-Konzentration. Die Initialkonzentration der Oligonukleotide beträgt 0,7 µM. Bei dem NLS _{Cys} -Peptid wurde 2 µM eingesetzt.	107
Abbildung 44: Verteilung des hydrodynamischen Partikeldurchmessers von AuNP-5'LNA30 _{T10} - und AuNP-5'LNA30 _{T10} -NLS _{Cys} -Konjugaten vor und nach der Aufreinigung mittels präparativer Ultrazentrifugation. ⁵ Die Initialkonzentration der Oligonukleotide beträgt 0,7 µM und die Initialkonzentration vom NLS _{Cys} -Peptid beträgt 2 µM.....	109
Abbildung 45: Vergleich verschiedener Peptide. Oberflächenbelegung (links) und Konjugationseffizienz (rechts) der Peptide NLS _{Cys} , CWR ₁₀ und CWKLPVM bei verschiedenen Initialkonzentrationen bei der Anbindung auf AuNP-5'LNA36 _{T10} -Konjugate. Die Initialkonzentration der Oligonukleotide beträgt 0,7 µM.	110
Abbildung 46: Vergleich verschiedener Peptide. Primärpartikelindex (A), Position des SPR-Peaks (B), hydrodynamischer Partikeldurchmesser (C) und Zetapotential (D) der Peptide NLS _{Cys} , CWR ₁₀ und CWKLPVM bei verschiedenen Initial-Konzentrationen bei der Anbindung auf AuNP-5'LNA36 _{T10} -Konjugaten. Die gestrichelten Kennlinien markieren die Werte der AuNP-LNA-Konjugate ohne Peptid. Die Initialkonzentration der Oligonukleotide beträgt 0,7 µM.....	112
Abbildung 47: Stabilität von bifunktionalen Konjugaten. Darstellung des Primärpartikelindex von bifunktionalen Konjugaten für die Biomoleküle Liponsäure, 5'LNA36 _{T10} , SAP und CWR ₁₀ auf der Basis von Citrat-, Chlorid- und Phosphat-konjugierten Goldnanopartikeln in Abhängigkeit der Ladung pro Nanopartikel (A) und des pH-Wertes. (B) Die blauen Kennlinien stellen die Werte der ligandenfreien	

Nanopartikel (ohne Ex-situ-Zugabe von Salz und Liganden) dar. Die Ionenstärken der Salze betragen 0 – 54 mM NaCl, 0 – 108 mM Trinatriumcitrat und 8,6 - 17,2 mM NaPP. Die eingesetzten Ligandenkonzentrationen betragen 69 µM Liponsäure, 2 µM 5'LNA36 _{T10} , 22 µM SAP und 10 µM CWR ₁₀	117
Abbildung 48: Stabilität von bifunktionalen Konjugaten. Darstellung des Zetapotentials von bifunktionalen Konjugaten für die Biomoleküle Liponsäure, 5'LNA36 _{T10} , SAP und CWR ₁₀ auf der Basis von Citrat-, Chlorid- und Phosphat-konjugierter Goldnanopartikel in Abhängigkeit der Ladung pro Nanopartikel (A) und des pH-Wertes. (B) Die blauen Kennlinien stellen die Werte der ligandenfreien Nanopartikel (ohne Ex-situ-Zugabe von Salz und Liganden) dar. Die Ionenstärken der Salze betragen 0 – 54 mM NaCl, 0 – 108 mM Trinatriumcitrat und 8,6 - 17,2 mM NaPP. Die eingesetzten Ligandenkonzentrationen betragen 69 µM Liponsäure, 2 µM 5'LNA36 _{T10} , 22 µM SAP und 10 µM CWR ₁₀	119
Abbildung 49: Darstellung der Oberflächenbeladung an Liponsäure, SAP und 5'LNA36 _{T10} auf Citrat- und Phosphat-konjugierten Goldnanopartikeln in Abhängigkeit der Ladung pro Nanopartikel (A) und des pH-Wertes. (B) Die Ionenstärken der Salze betragen 0 – 54 mM NaCl, 0 – 108 mM Trinatriumcitrat und 8,6 - 17,2 mM NaPP. Die eingesetzten Ligandenkonzentrationen betragen 69 µM Liponsäure, 2 µM 5'LNA36 _{T10} , 22 µM SAP und 10 µM CWR ₁₀	123
Abbildung 50: Schematische Darstellung der durchgeführten biologischen Experimente.	126
Abbildung 51: Zusammenhang zwischen biologischer Anwendung und Konjugatvarianten: Darstellung von Goldnanopartikel-Konjugaten mit zwei möglichen Oberflächenbedeckungen. Die Verwendung von thiolisierten Oligonukleotiden stabilisiert die Partikel und führt zu Einzelpartikel-Konjugaten. (links) Eine reine Peptidkonjugation führt zur Bildung von Agglomeraten. (rechts) Es können mehrere Liganden in einem Konjugat eingesetzt werden. Beispiele hierfür sind unter den Agglomeraten gezeigt.....	127
Abbildung 52: Zusammenhang zwischen biologischer Anwendung und Konjugatvarianten: Baumdiagramm zur Analyse des vorliegenden Systems und zur Ermittlung notwendiger Parameter zur Herstellung von AuNP-Konjugaten.....	128
Abbildung 53: Netzdiagramme zur Bewertung der Partikel-Konjugat-Eigenschaften bezüglich der Anwendung mit Bullenspermien, zur Transfektion mit regulatorischen T-Zellen und zur intrazellulären Optoporation.....	130

Abbildung 54: Stabilität von AuNP-5'LNA30 _{T10} in verschiedenen Puffern. Darstellung von UV-Vis-Spektren der Konjugate in TRIS (oben), PBS (mitte) und PBS mit 10 mM MgCl ₂ (unten). (A) Primärpartikelindex der Konjugate in den genannten Puffern in Abhängigkeit der Lagerungszeit. (B)	134
Abbildung 55: Einfluss der Temperatur auf AuNP-LNA-Konjugate. Darstellung der Goldkonzentration (A) und der Verschiebung des SPR-Peaks (B) abhängig von der Temperatur. Es wurden Konjugate mit unterschiedlichen Mengen an Natriumchlorid während der Konjugation untersucht.	136
Abbildung 56: Einfluss der Temperatur auf AuNP-LNA-Konjugate. Darstellung des hydrodynamischen Partikeldurchmessers der Konjugate in Abhängigkeit der Temperatur. Es wurden Konjugate mit unterschiedlichen Mengen an Natriumchlorid während der Konjugation untersucht. (A) Darstellung des hydrodynamischen Partikeldurchmessers normiert auf den Anfangswert bei 20°C vor dem Erhitzen der Probe in Abhängigkeit der Temperatur. (B)	137
Abbildung 57: Darstellung der Schmelztemperatur des Duplex und Triplex von AuNP-5'LNA10 zur Ermittlung des Einflusses der Menge an LNA-Liganden pro dsDNA auf die Hybridisierung. (A) Darstellung der Menge an auswertbaren Experimenten für vier verschiedene Sequenzen. (B)	139
Abbildung 58: Darstellung der Schmelztemperatur des Duplex und Triplex verschiedener LNA-Sequenzen mit und ohne Goldnanopartikel und zur Ermittlung des Einflusses eines NLS _{Cys} -Peptids auf die Hybridisierung.	141
Abbildung 59: Darstellung des hydrodynamischen Partikeldurchmessers (B), des Feret-Durchmessers und der Interpartikelabstände von AuNP-5'LNA36 _{T10} -Konjugaten (A) mit und ohne NLS _{Cys} -Peptid sowie als Hybrid mit dsDNA.....	144
Abbildung 60: Bestimmung der Anlagerung von Konjugaten an die Spermien in Abhängigkeit verschiedener Oberflächenfunktionalisierungen. Vergleich der ausgefallenen Goldmasse nach Zugabe der Konjugate in TRIS-Puffer mit der Goldmasse, welche sich nach Inkubation mit den Spermien in dem abgetrennten Pellet befinden.....	148
Abbildung 61: Korrelation der ausgefallenen Goldmasse (TRIS-Puffer) mit der Goldmasse, welche sich nach Inkubation mit den Spermien in dem abgetrennten Pellet befinden, unabhängig von der eingesetzten Oberflächenfunktionalisierung. (A) Transmissionselektronische Aufnahmen von Rinderspermien zur Ermittlung der	

Partikel-Membran-Wechselwirkungen. Die Spermien wurden zuvor 2 Stunden bei 37°C mit verschiedenen Konjugaten inkubiert. (B)	150
Abbildung 62: Darstellung einer repräsentativen TEM-Aufnahme von Spermien inkubiert mit AuNP-5'LNA30 _{T10} -Konjugaten. (A) Die Vergrößerung (C) zeigt die Anordnung der Partikel zwischen zwei Spermien. Darstellung des Interpartikelabstands (B) und des Feret-Durchmessers (D) von verschiedenen Goldnanopartikel-Konjugaten, welche sich nach der Inkubation an der Spermienmembran befinden. Die Sequenz der verwendeten LNA ist 5'LNA30 _{T10} .	151
Abbildung 63: Schematische Darstellung der Partikelanordnung an der Spermienmembran.	153
Abbildung 64: Differenzierung von toten und lebenden Spermien anhand der Fluoreszenzlebensdauer der Farbstoffe AlexaFluor488 und Fluorescein, welche an den Liganden der Oberflächenbedeckung der Nanocluster gekoppelt sind. Konfokalmikroskopische Aufnahme (A) und visuelle Darstellung der Fluoreszenzlebensdauer (B) von Spermien, welche mit 0,5 µg/mL AuNC _{2 nm} -LNA 2 Stunden inkubiert wurden. In A) sind die Goldnanocluster in grün dargestellt, eine Tot-Färbung wurde mittels Propidiumiodid (rot) durchgeführt. Eine Lebensdauer von 2 ns ist in B) blau dargestellt, während 4 ns rot dargestellt sind. C) Spektrum der Fluoreszenzlebensdauer von AuNC _{2 nm} -LNA-Konjugaten. D) Darstellung der Fluoreszenzlebensdauer von AuNP-LNA, AuNP-NLS _{Cys} und AuNP-LNA-NLS _{Cys} an oder in lebenden und toten Spermien.....	155
Abbildung 65: Aufbau eines Spermiums und Darstellung der einzelnen Segmente der Spermienmembran. Diese Graphik wurde adaptiert nach Barchanski et al. [151]..	158
Abbildung 66: Konfokalmikroskopische Aufnahme (A) und Aufnahmen der Fluoreszenzlebensdauer (B-F) von AuNC _{2 nm} -LNA-Konjugaten inkubiert mit Rinderspermien bei Konzentrationen von 0,2 µg/mL, 0,4 µg/mL, 0,8 µg/mL, 1,6 µg/mL und 3,3 µg/mL. Eine Lebensdauer von 2 ns wird blau dargestellt und eine Lebensdauer von 4 ns wird rot dargestellt. Zwischenwerte werden grün dargestellt.....	159
Abbildung 67: Anlagerung von AuNC _{2 nm} -LNA-Konjugaten an Rinderspermien. A) Linescan quer über die Spermien zur Ermittlung der Anlagerungshäufigkeit auf den Spermien. B) Darstellung der Fluoreszenzlebensdauer der verschiedenen Kompartimente auf dem Spermienkopf in Abhängigkeit der Anzahl an Clustern pro Spermium. C) 3D-Darstellung eines Spermiums aufgenommen mittels	

Konfokalmikroskopie. D) AFM-Aufnahme eines Spermiums zur Ermittlung der Oberflächenfestigkeit der Spermienmembran.	160
Abbildung 68: Schematische Darstellung von einem Spermium, einem Spermienkopf und genomische DNA zur Verdeutlichung der räumlichen Anordnung der DNA in verschiedenen Zuständen.	163
Abbildung 69: Hybridisierung von Goldnanopartikeln, welche mit LNA-Sonden funktionalisiert worden sind. Hydrodynamischer Partikeldurchmesser (Volumenverteilung) (A) und Zetapotential (B) von AuNP-5'LNA30 _{T10} -Konjugaten nach der Hybridisierung mit demembraniserten Spermienköpfen und genomischer DNA unter Verwendung von 5 nm großen Goldnanopartikeln.	165
Abbildung 70: Hybridisierung von Goldnanopartikeln, welche mit LNA-Sonden funktionalisiert sind. Darstellung der Schmelztemperatur von AuNP-5'LNA30 _{T10} -Konjugaten nach der Hybridisierung mit demembraniserten Spermienköpfen und genomischer DNA unter Verwendung von 5 nm großen Goldnanopartikeln.	166
Abbildung 71: Hybridisierung von LNA-Sonden, welche an Goldnanopartikel gebunden wurden. Verschiebung des SPR-Peaks (A) und der normierten Extinktion im nahen Infrarot-Bereich (B) von AuNP-LNA-Konjugaten nach der Hybridisierung mit demembraniserten Spermienköpfen sowie genomischer DNA für 5 nm und 34 nm große Goldnanopartikel ebenso wie verschiedene LNA-Sequenzen.....	168
Abbildung 72: Hybridisierung von LNA-Sonden, welche mit Goldnanopartikeln funktionalisiert wurden. Darstellung der normierten Streu-Intensität berechnet aus den Flächen der gemessenen Streulicht-Spektren von AuNP-5'LNA30 _{T10} -Konjugaten nach der Hybridisierung mit demembraniserten Spermienköpfen und genomischer DNA unter Verwendung von 34 nm großen Goldnanopartikeln.	171
Abbildung 73: Aufnahme von Goldnanopartikel-Konjugaten. Murine Splenozyten wurden in Anwesenheit und Abwesenheit von $0,16 \cdot 10^6$, $0,81 \cdot 10^6$, $1,62 \cdot 10^6$, $2,03 \cdot 10^6$ oder $8,1 \cdot 10^6$ Alexa488-markierten Nanopartikel-Konjugaten pro Zelle vier Stunden inkubiert. Die Menge an Alexa488 positiven Zellen wurde bezüglich der lebenden Teilmenge A) CD11b ⁺ Makrophagen, B) CD11c ⁺ DCs, C) regulatorische T-Zellen CD25 ⁺ , D) CD8 ⁺ T-Zellen, E) CD4 ⁺ T-Zellen und F) CD19 ⁺ B-Zellen mittels FACS bestimmt. Es wurde eine Varianzanalyse mit nachfolgendem Dunett-Test durchgeführt, um die statistische Relevanz zu ermitteln. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001. Die Graphik ist adaptiert nach Gamrad et al. [209]......	174

Abbildung 74: Konfokalmikroskopische Aufnahmen von AuNP-LNA-NLS _{Cys} -Konjugaten, welche von regulatorischen T-Zellen CD25 ⁺ aufgenommen wurden. Darstellung der Nanopartikel durch eine Markierung der Liganden mit Alexa ₄₈₈ in grün. (A); Darstellung der Nanopartikel-Konjugate (grün), welche in regulatorische T-Zellen aufgenommen wurden. Die Zellen sind DAPI-gefärbt und blau dargestellt. (B) Die Graphik wurde von Gamrad et al. [209] übernommen.....	175
Abbildung 75: Nanopartikel, welche in Vesikeln der T-Zellen aufgenommen wurden. Übersicht der Zelle zur Darstellung der Lage der Vesikel. (A, B); Vergrößerung des Vesikels, um die Lage der Nanopartikel deutlicher zu erkennen. (C, D) Die Graphik ist adaptiert nach Gamrad et al. [209].	176
Abbildung 76: Herunterregulierung der eGFP-Expression in murinen eGFP ⁺ regulatorischen T-Zellen durch siRNA-gekoppelte Goldnanopartikel-Konjugate. Frisch isolierte eGFP ⁺ regulatorische T-Zellen wurden mit siRNA-gekoppelte Nanopartikel-Konjugate ($0 \cdot 10^6$; $1,6 \cdot 10^6$ und $3,2 \cdot 10^6$ Partikel pro Zelle) und mit Konjugaten ohne siRNA als Kontrolle inkubiert. Die eGFP-Expression wurde als mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der lebenden Zellen mittels Durchflusszytometrie nach zwei Tagen (A) und nach drei Tagen (B) untersucht. Der Messwert wurde als prozentualer Anteil der unbehandelten CD25 ⁺ Zellen (= 100%) berechnet. Es wurde eine Varianzanalyse mit nachfolgendem Bonferroni's-Test durchgeführt, um die statistische Relevanz zu ermitteln. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Die Graphik ist adaptiert nach Gamrad et al. [209].	177
Abbildung 77: Aufnahme von AuNP-CPP-Konjugaten in ZMTH3-Zellen. Darstellung der mittleren AuNP-Fläche pro Zelle in Abhängigkeit der Inkubationsdauer für verschiedene Nanopartikel-Konzentrationen. Die Ermittlung der Daten ist in Kapitel 7.2.4.2 beschrieben. (A) Multiphotonenmikroskopie-Bilder: Anregung bei 1050 nm zeigt die Zellmembran, welche mit CellMask Orange angefärbt wurde, und die Lumineszenz der Konjugate. C) Darstellung der Lumineszenz von AuNP-CPP-Konjugaten, welche bei 720 nm angeregt wurden und bei der die Zellmembran nicht angeregt wird. (B) Die Abbildung ist adaptiert nach Gamrad et al. [72].	181
Abbildung 78: TEM-Aufnahmen von AuNP-CPP-Konjugaten, welche in ZMTH3-Zellen mittels Endozytose aufgenommen wurden. A) Goldnanopartikel befinden sich in Endosomen verschiedener Reifegrade der Zellen. (EE: frühe Endosomen; LE: späte Endosomen; L: Lysosomen) Maßbalken der Vergrößerung: 100 nm. B) Überblick einer	

Zelle mit einem Endosom, welches mit Nanopartikeln gefüllt ist. Die Abbildung ist adaptiert nach Krawinkel et al. [223].	182
Abbildung 79: Aufnahmen von Hellfeld-Mikroskopie (A, D) und Fluoreszenzmikroskopie (B, C) von AuNP-CPP-Agglomeraten aufgenommen in ZMTH3-Zellen vor (A, B) und nach (C, D) der Laserbestrahlung. E) Darstellung der effizienten intrazellulären Freisetzung in Abhängigkeit verschiedener Bestrahlungsfluenzen. Die Kreuze stellen den maximalen und minimalen Wert des Datensatzes dar. Ein zweifacher T-Test weist auf einen signifikanten Anstieg ab 25 mJ/cm ² hin. (**p < 0.001, *p < 0.04). Die Box enthält 25 - 75% der Datenwerte und die Linie stellt den Median des Datensatzes dar. Die Abbildung ist adaptiert nach Krawinkel et al. [223].	185
Abbildung 80: Effekt der Laserbestrahlung auf AuNP-CPP-Agglomerate. Darstellung der SPR-Peak-Verschiebung (A) und der Veränderung der Größenverteilung (B) vor und nach der Bestrahlung von AuNP-CPP-Agglomeraten mit 35 mJ/cm ² .	187
Abbildung 81: TEM-Aufnahmen von laserbestrahlten Zellen, welche AuNP-CPP-Konjugate mittels Endozytose aufgenommen haben. Die Zellen wurden mit 25 mJ/cm ² (A) und 35 mJ/cm ² (B, C) bestrahlt. Die roten gestrichelten Pfeile weisen auf aufgebrochene Endosomen hin und die Partikel, welche aus diesen Endosomen vereinzelt ins Zytoplasma gelangen konnten, wurden rot eingekreist. Blaue Pfeile weisen auf laser-induzierte Vakuolen hin. Vakuolen in Mitochondrien sind mit grünen Pfeilen gekennzeichnet und aufgesprengte Lumen des endoplasmatischen Retikulums mit gelben Pfeilen. Die eingezeichneten Maßbalken entsprechen 500 nm (A), 300 nm (B), 100 nm (Vergrößerung in B) und 800 nm. Die Abbildung ist adaptiert nach Krawinkel et al. [223].	189

7.7. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Aufstellung der Maximal- (N_{Max}) und Sättigungsbeladung (N_{Sat}), welche mittels Ultrazentrifugation und Zentrifugalfiltration ermittelt wurden. Die daraus berechneten Werte für den Footprint K sind ebenfalls aufgeführt.....	85
Tabelle 2: Parameter und Einstellungen des UV-Vis Spektrometers.....	227
Tabelle 3: Parameter und Einstellungen zur Partikelgrößenanalyse mittels ASZ... 228	228
Tabelle 4: Parameter und Einstellungen zur Partikelgrößenanalyse mittels AUZ... 228	228
Tabelle 5: Parameter und Einstellungen bei der DLS zur Bestimmung der Größe und des Zetapotentials.	229
Tabelle 6: Parameter und Einstellungen des Fluoreszenz-Spektrometers.	231
Tabelle 7: Anregungs- und Emissionswellenlängen für die eingesetzten Farbstoffe.	232
Tabelle 8: Aufstellung der verwendeten Analysen- und Aufreinigungsgeräte.....	233
Tabelle 9: Auflistung der verwendeten Oligonukleotide.....	234
Tabelle 10: Auflistung der verwendeten Peptide.	236
Tabelle 11: Auflistung der eingesetzten biologischen Materialien.	237
Tabelle 12: Auflistung der Materialien, welche in dieser Arbeit verwendet wurden. 238	238
Tabelle 13: Auflistung der Laser- und Scanparameter, welche bei der Laserablation von ligandenfreien Goldnanopartikeln in Flüssigkeiten verwendet wurden.	239
Tabelle 14: Auflistung der Laser- und Scanparameter, welche bei der Fragmentierung bimodalen Goldnanopartikeln in Flüssigkeiten verwendet wurden.	240
Tabelle 15: Auflistung der eingesetzten Goldnanopartikel-, Oligonukleotid- und Natriumchlorid-Konzentrationen und der eingesetzten Oligonukleotid-pro-AuNP-Verhältnisse.....	241
Tabelle 16: Auflistung der eingesetzten Goldnanopartikel- und Thiol-Ligand- bzw. Anionen-Konzentrationen ebenso wie der eingesetzten Ligand-pro-AuNP- bzw. Anionen-pro-AuNP-Verhältnisse bezogen auf 50 µg/mL Goldnanopartikel.	242
Tabelle 17: Zusammensetzung des PBS-Puffers in einfacher Konzentration.....	244
Tabelle 18: Auflistung der verwendeten Abkürzungen.	252
Tabelle 19: Auflistung der verwendeten Variablen.	253

7.8. Ergänzende Graphiken zum Kapitel Ergebnisse und Diskussion

7.8.1. Kalibrationen

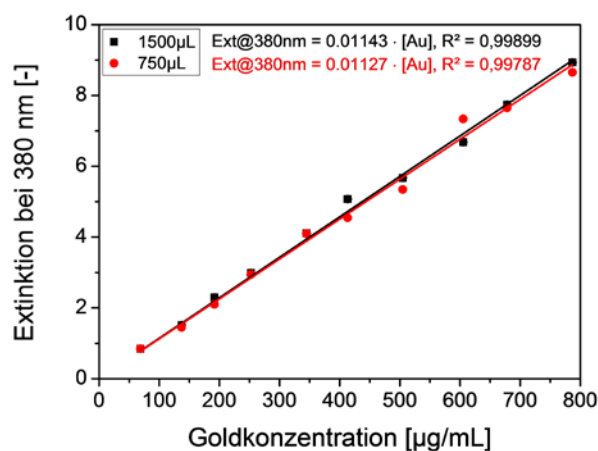


Abbildung 82: Kalibration zur Bestimmung der Goldkonzentration eines Kolloids mittels UV-Vis-Spektrometrie.

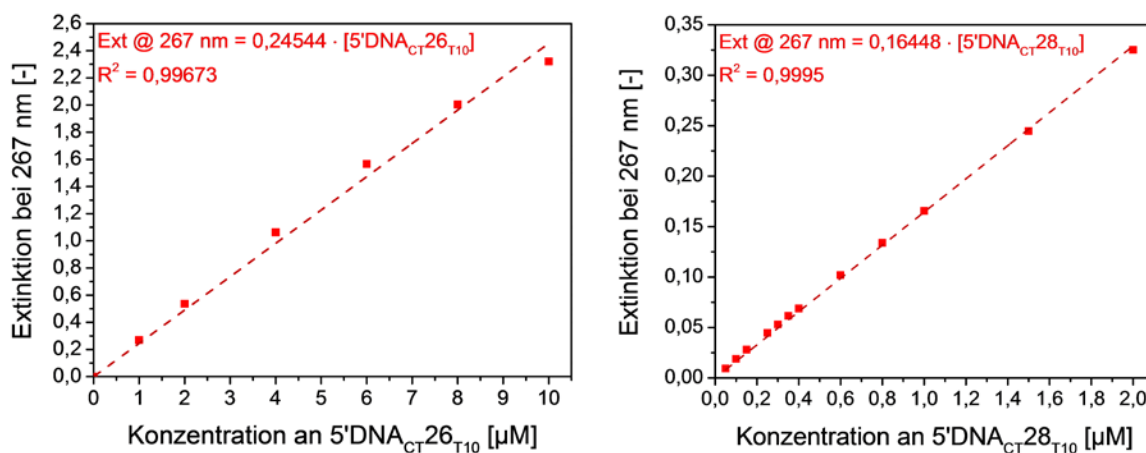


Abbildung 83: Kalibration zur Bestimmung der Menge an 5'DNA_{CT26T10} (links) und an 5'DNA_{CT28T10} (rechts) mittels UV-Vis-Spektrometrie.

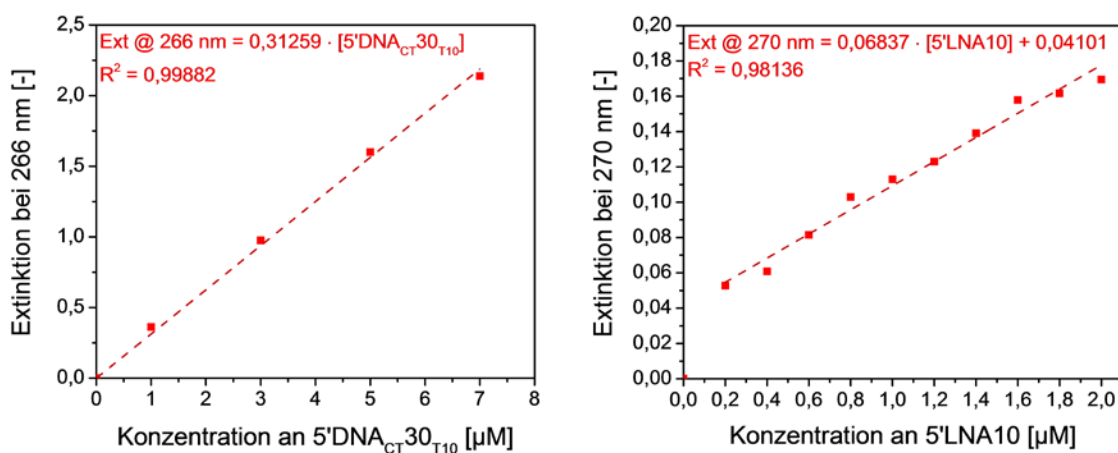


Abbildung 84: Kalibration zur Bestimmung der Menge an 5'DNA_{CT30T10} (links) und an 5'LNA10 (rechts) mittels UV-Vis-Spektrometrie.

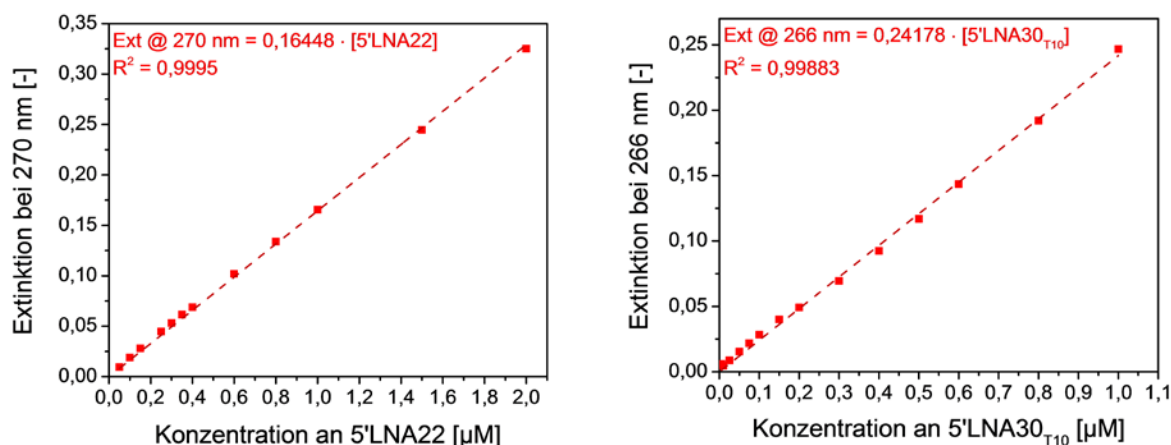


Abbildung 85: Kalibration zur Bestimmung der Menge an 5'LNA22 (links) und an 5'LNA30_{T10} (rechts) mittels UV-Vis-Spektrometrie.

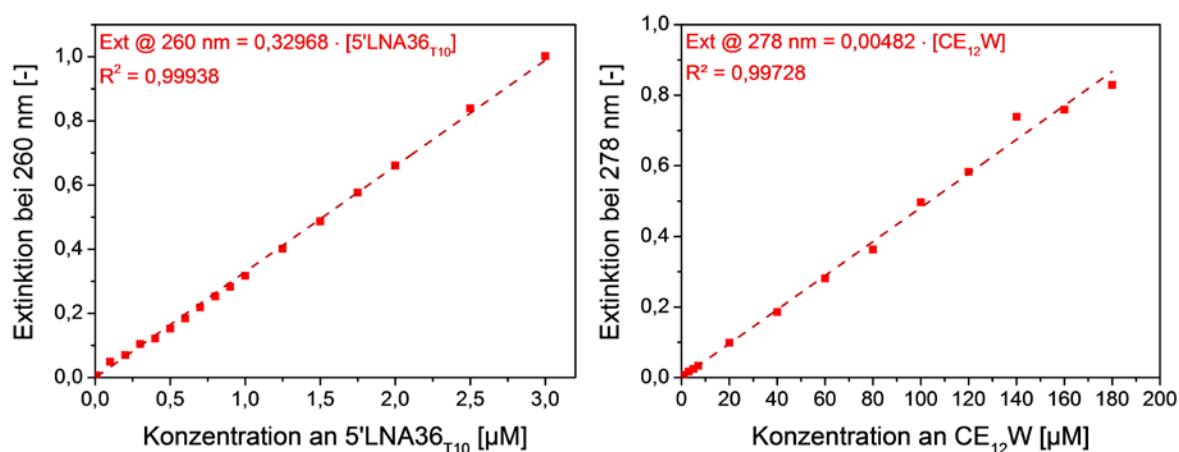


Abbildung 86: Kalibration zur Bestimmung der Menge an 5'LNA36_{T10} (links) und an CE₁₂W (rechts) mittels UV-Vis-Spektrometrie.

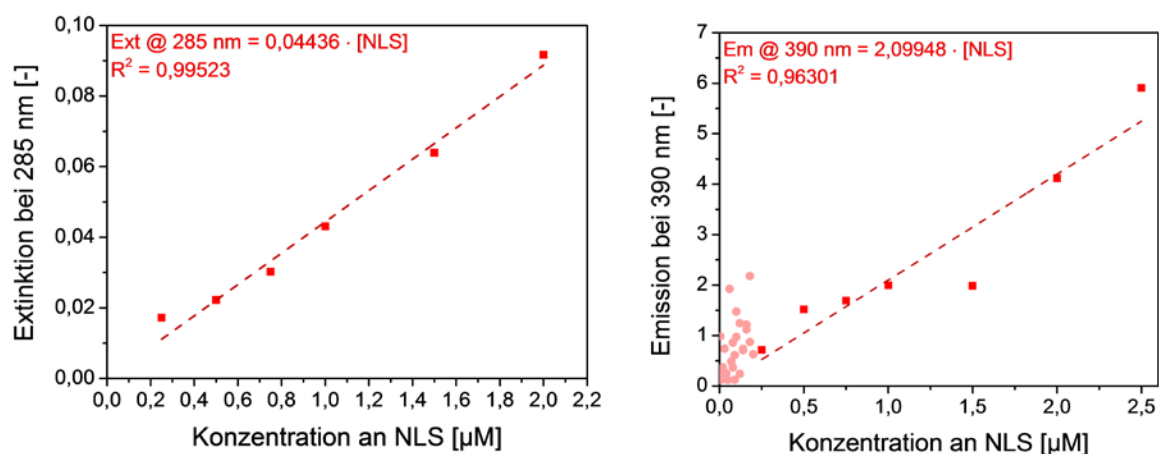


Abbildung 87: Kalibration zur Bestimmung der Menge an NLS_{Cys} mittels UV-Vis-Spektrometrie (links) und Fluoreszenz-Spektrometrie. (rechts)

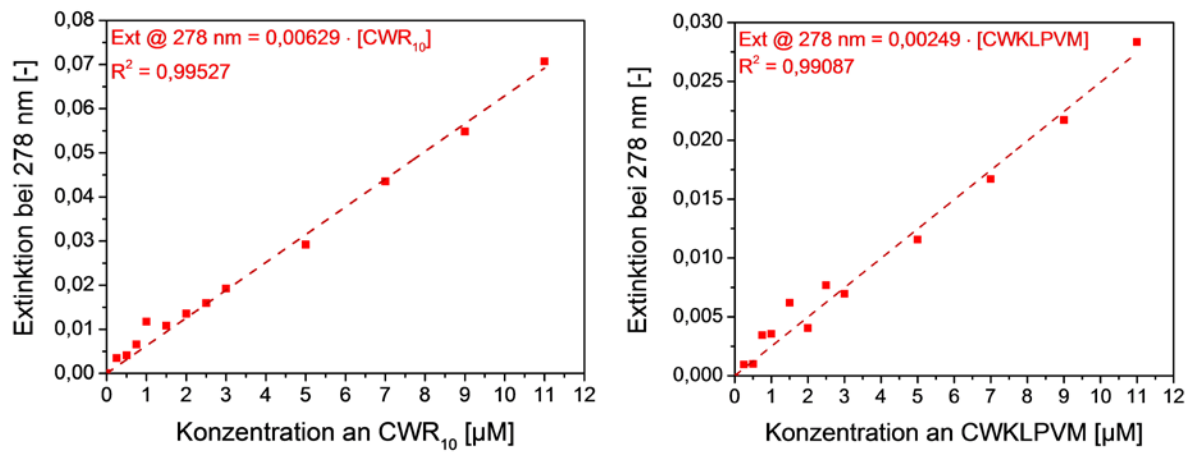


Abbildung 88: Kalibration zur Bestimmung der Menge an CWR₁₀ (links) und an CWKLPVM (rechts) mittels UV-Vis-Spektrometrie.

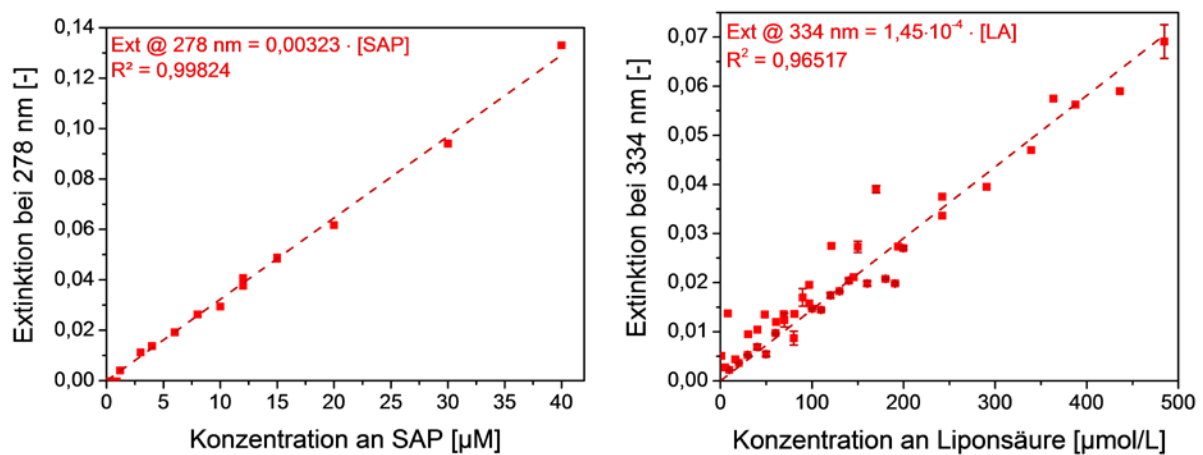


Abbildung 89: Kalibration zur Bestimmung der Menge an SAP (links) und an Liponsäure (rechts) mittels UV-Vis-Spektrometrie.

7.8.2. Synthese und Größenkontrolle ligandenfreier Goldnanopartikel

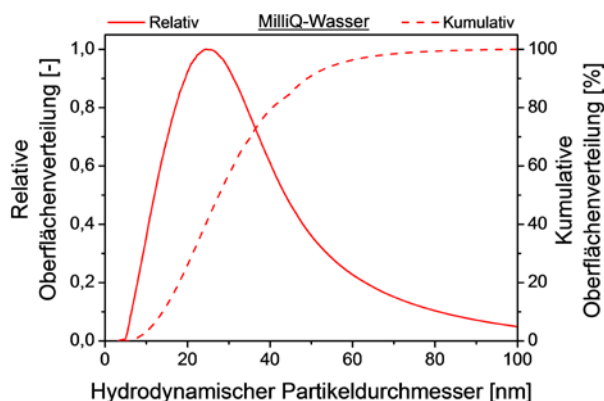


Abbildung 90: Relative (links) und kumulative (rechts) Oberflächenverteilung von Goldnanopartikeln in Wasser.

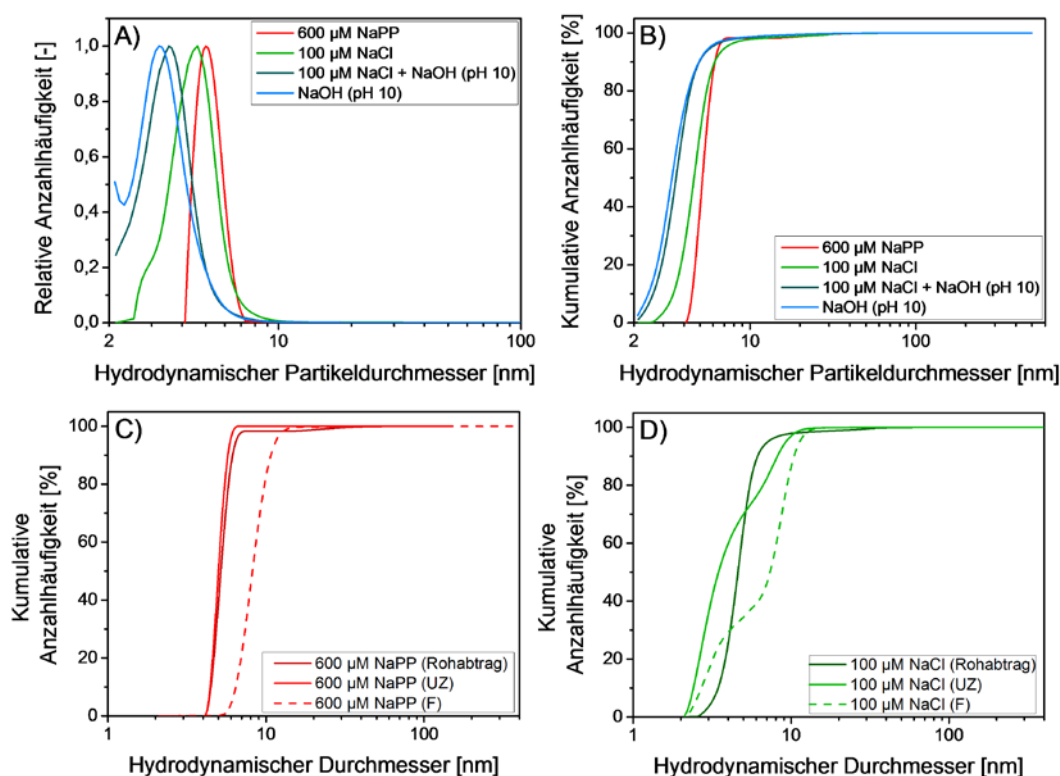


Abbildung 91: Relative (A) und Kumulative (B) Anzahlhäufigkeitsverteilungen der Goldnanopartikel nach dem Rohabtrag in verschiedenen Abtragsmedien. Kumulative Anzahlhäufigkeit von Goldnanopartikeln, welche in 600 µM NaPP (C) und 100 µM NaCl hergestellt wurden und mittels Fragmentierung und Ultrazentrifugation nachbehandelt wurden.

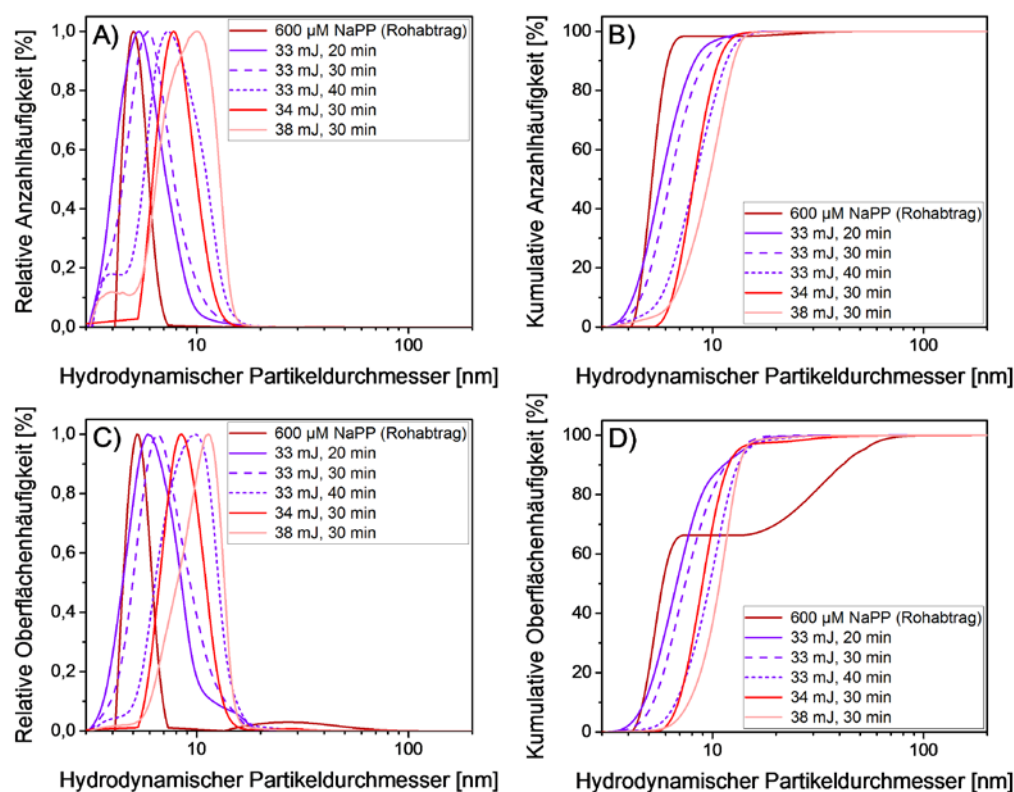


Abbildung 92: Relative Anzahl- und Oberflächenhäufigkeitsverteilungen (A, C) sowie Kumulative Anzahl- und Oberflächenhäufigkeitsverteilungen (B, D) von Goldnanopartikeln, welche in 600 μM NaPP hergestellt wurden und bei verschiedenen Parametern fragmentiert wurden.

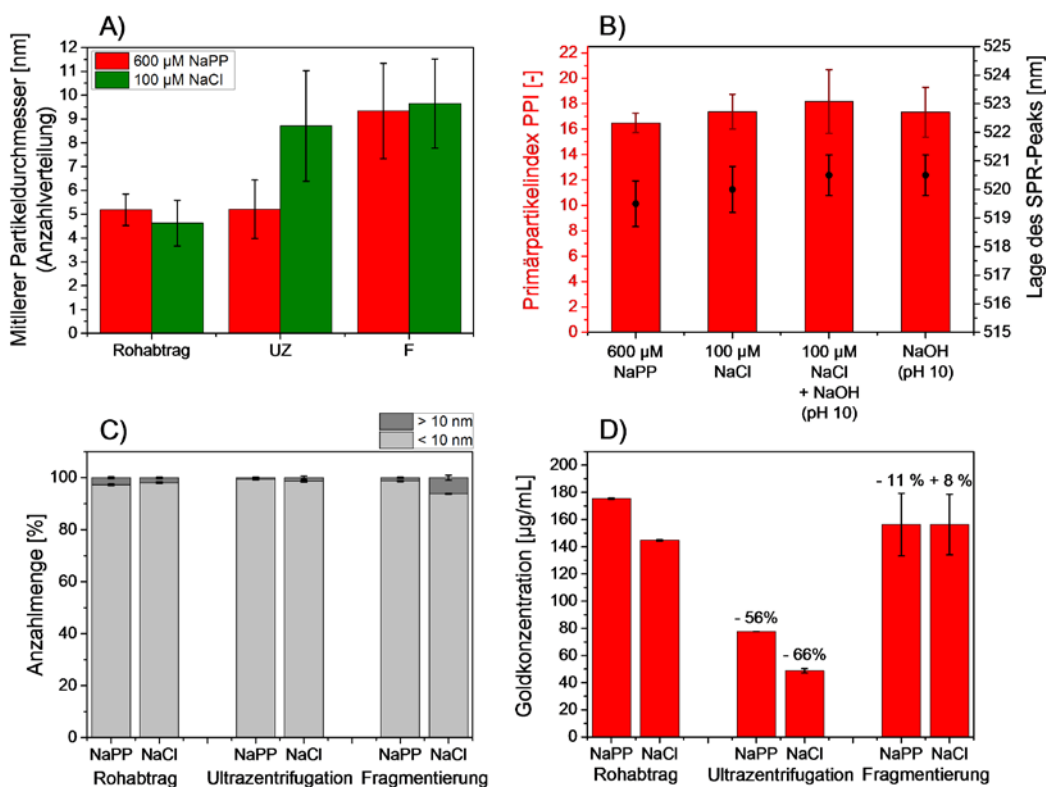


Abbildung 93: Darstellung des mittleren Partikeldurchmessers aus der Anzahlverteilung (A), der Anzahlmenge für Goldnanopartikel <10 nm und >10 nm (C) und der Goldkonzentration (D) von Goldnanopartikeln, welche in 600 μM NaPP und 100 μM NaCl hergestellt wurden und mittels Fragmentierung und Ultrazentrifugation nachbehandelt wurden. Darstellung des Primärpartikelindex PPI und der Lage des SPR-Peaks (B) von Goldnanopartikeln, welche in verschiedenen Abtragsmedien hergestellt wurden.

Tabelle 19: Auflistung der Werte des Polydispersitätsindex PDI von Goldnanopartikeln, welche in 600 μM NaPP und 100 μM NaCl hergestellt wurden und mittels Fragmentierung und Ultrazentrifugation nachbehandelt wurden.

		Anzahlverteilung	Volumenverteilung	Volumenverteilung
Rohabtrag	NaPP	0,04974	0,04743	0,01862
UZ	NaPP	0,05572	0,05007	
F	NaPP	0,04585	0,04638	
Rohabtrag	NaCl	0,04171	0,04003	0,02578
UZ	NaCl	0,07119	0,04911	
F	NaCl	0,03767	0,03787	

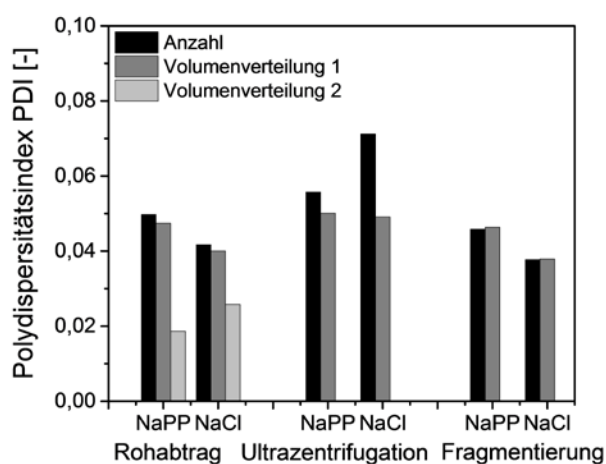


Abbildung 94: Darstellung des Polydispersitätsindex PDI von Goldnanopartikeln, welche in 600 μM NaPP und 100 μM NaCl hergestellt wurden und mittels Fragmentierung und Ultrazentrifugation nachbehandelt wurden.

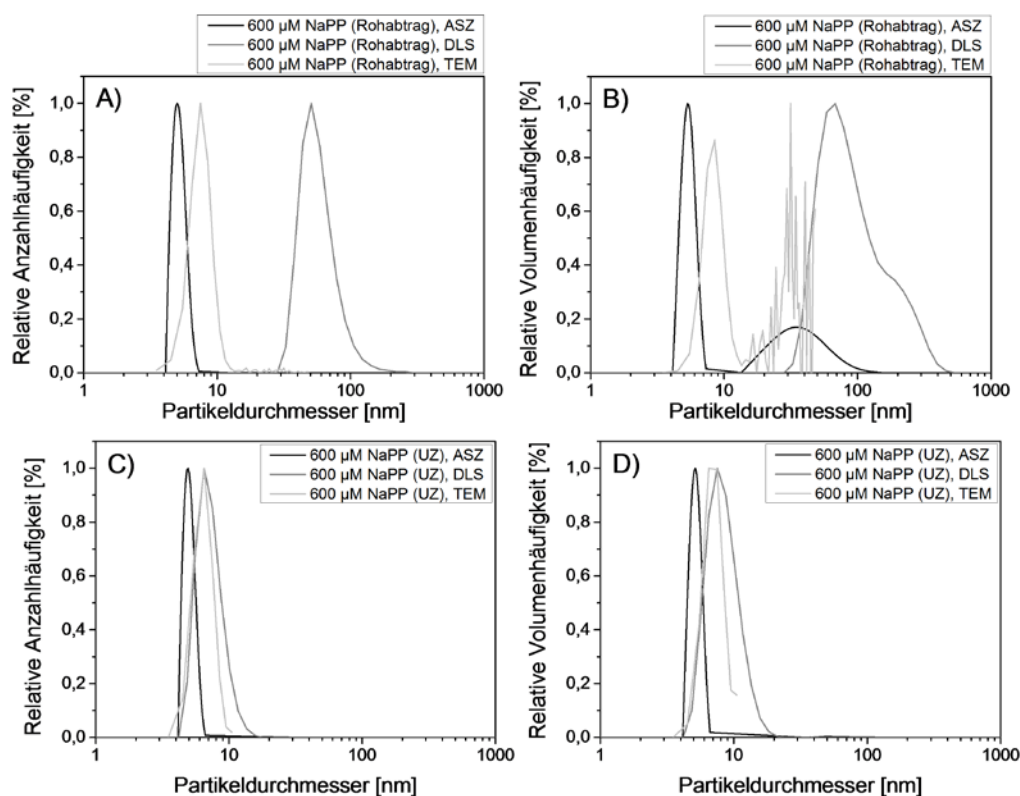


Abbildung 95: Darstellung der relativen Anzahlhäufigkeitsverteilung (A, C) und der relativen Volumenhäufigkeitsverteilung (B, D) der Rohabträge in 600 µM NaPP (A, B) und der ultrazentrifugierten Proben (C, D). Die Verteilungen wurden mittels Analytischer Scheibenzentrifuge (ASZ), Dynamischer Lichtstreuung (DLS) und TEM ermittelt.

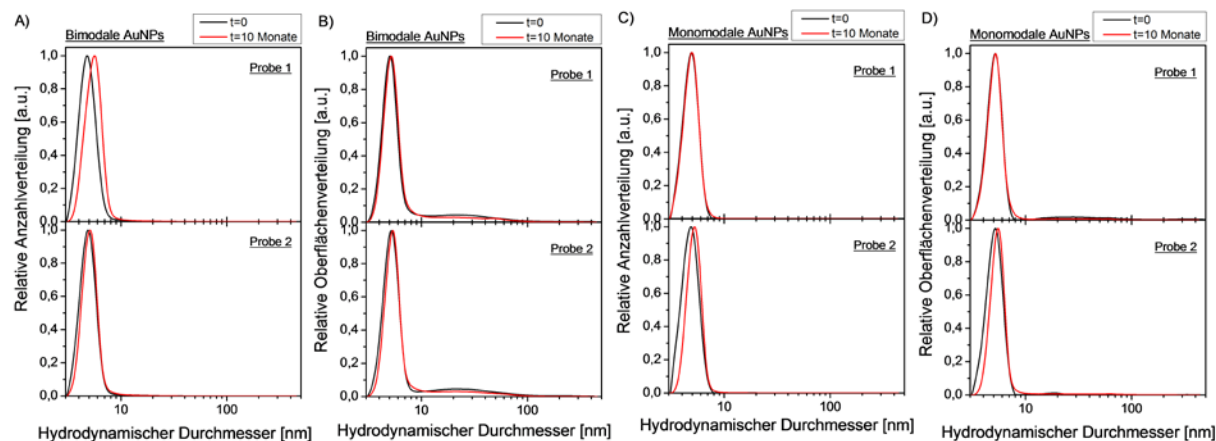


Abbildung 96: Darstellung der relativen Anzahl- und Oberflächenverteilung von bimodalen (A, B) und monomodalen (C, D) Goldnanopartikeln nach 0 und 10 Monaten.

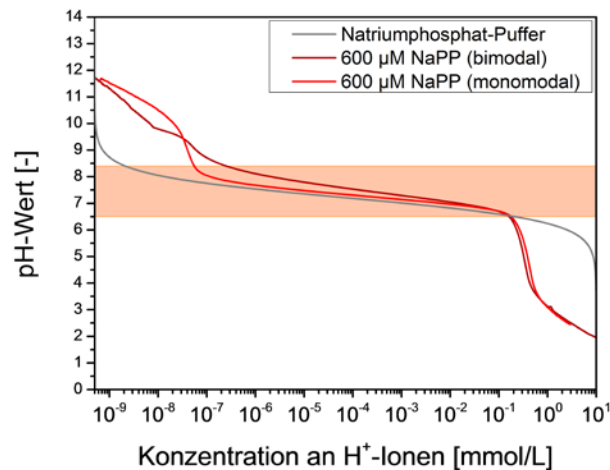


Abbildung 97: Titrationskurve von bimodalen und monomodalen Goldnanopartikeln im Vergleich mit der Titrationskurve des Natriumphosphat-Puffers (berechnet) zur Ermittlung eines Puffereffektes der Nanopartikel.

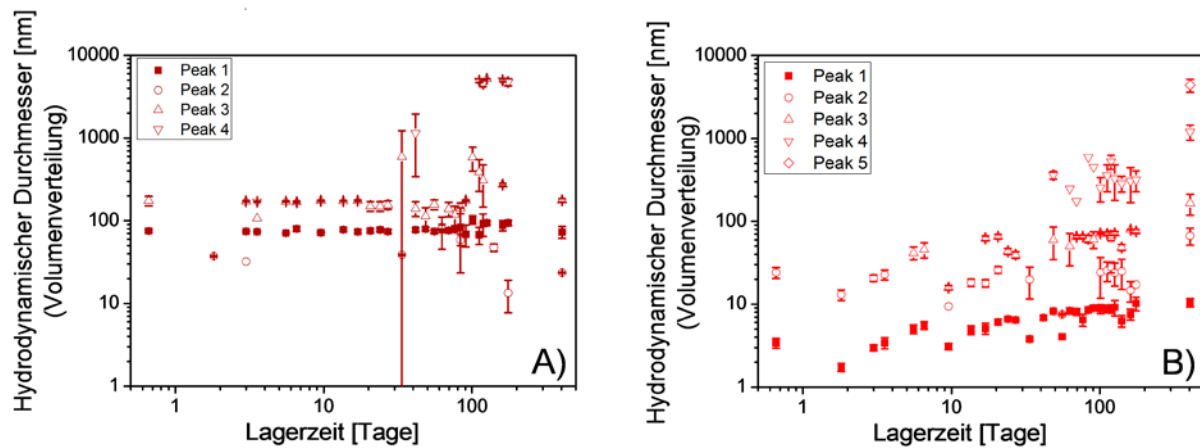
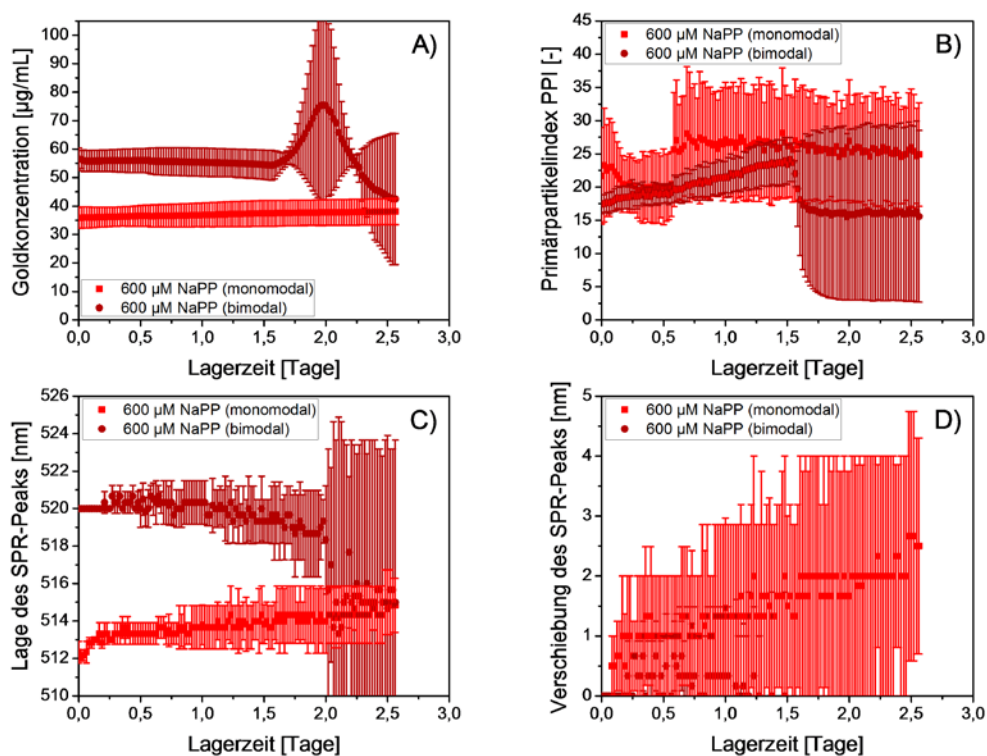
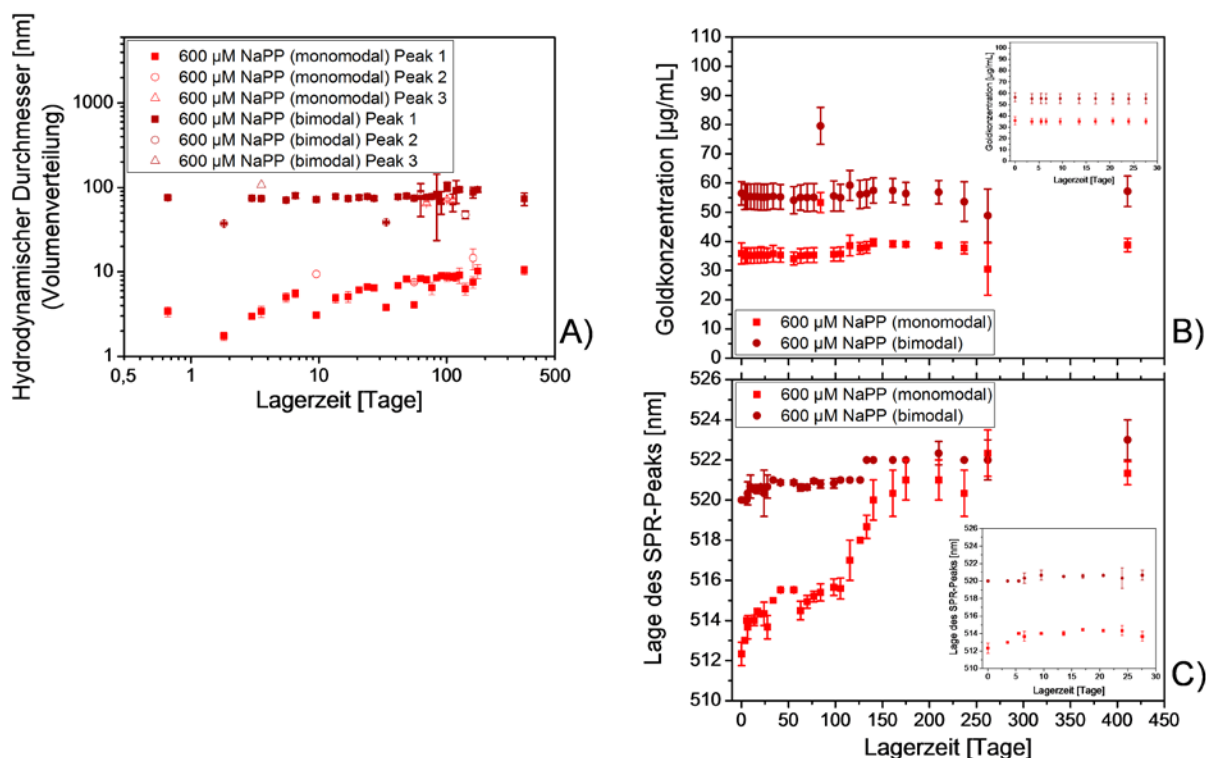


Abbildung 98: Langzeitstabilität der bimodalen (A) und monomodalen (B) Goldnanopartikel hergestellt in 600 μ M Natriumphosphatpuffer über einen Zeitraum von 13,5 Monate: Darstellung des Hydrodynamischen Partikeldurchmessers aus der Volumenverteilung. In beiden Abbildungen ist die Lagerzeit sowohl in Tagen (untere Achse) als auch in Monaten (obere Achse) dargestellt.



7.8.3. Einfluss von Salzen und kleinen Molekülen auf Goldnanopartikel

Einfluss von Salzen auf Goldnanopartikel

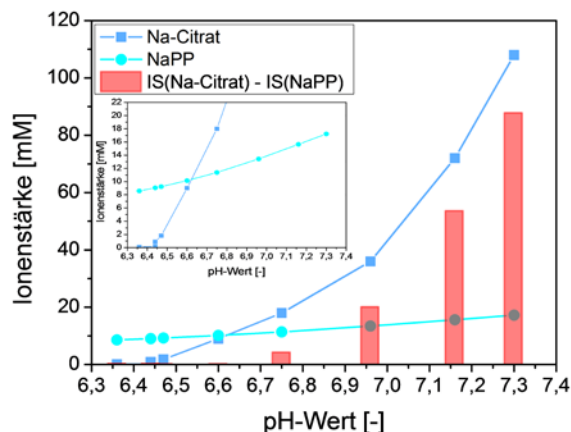


Abbildung 101: Darstellung der Ionenstärke in Abhängigkeit des pH-Wertes für Natrium-Citrat und Natriumphosphatpuffer.

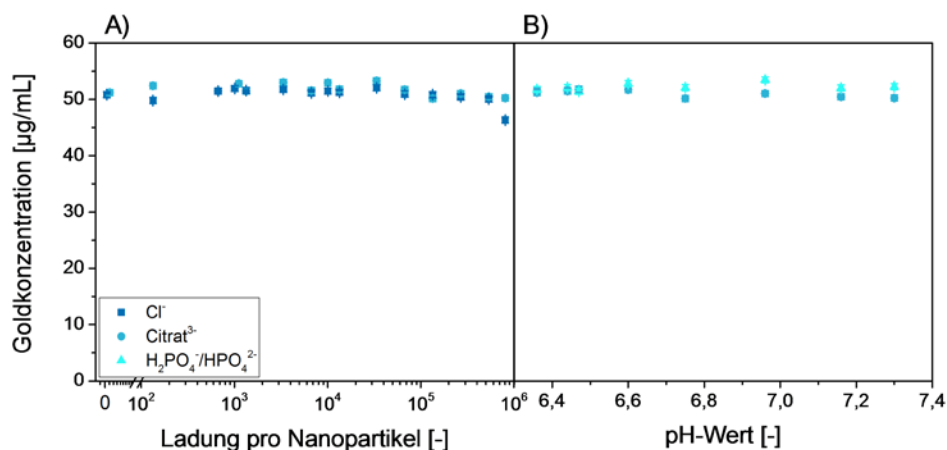


Abbildung 102: Einfluss von Natriumchlorid, Natriumphosphat-Puffer und Natriumcitrat auf Goldnanopartikel. Darstellung der Goldkonzentration in Abhängigkeit der Ladung pro Nanopartikel (A) und des pH-Wertes. (B)

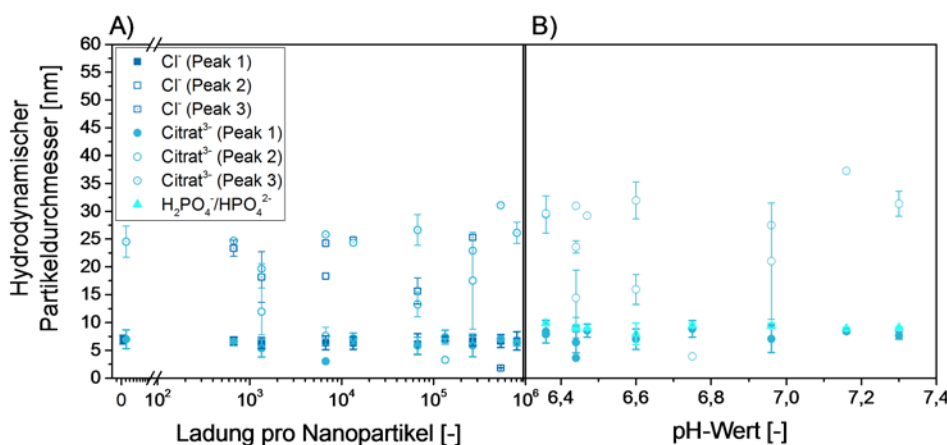


Abbildung 103: Einfluss von Natriumchlorid, Natriumphosphat-Puffer und Natriumcitrat auf Goldnanopartikel. Darstellung des hydrodynamischen Partikeldurchmessers in Abhängigkeit der Ladung pro Nanopartikel (A) und des pH-Wertes. (B)

Einfluss von Liponsäure auf Goldnanopartikel

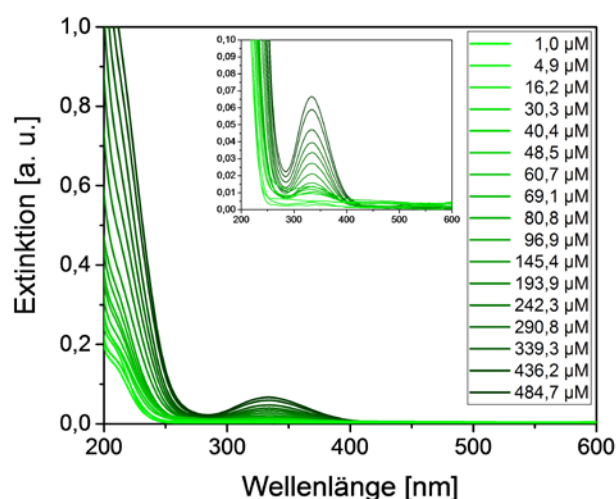


Abbildung 104: Extinktionsspektrum von Liponsäure in einem Konzentrationsbereich zwischen 1,0 und 484,7 μM .

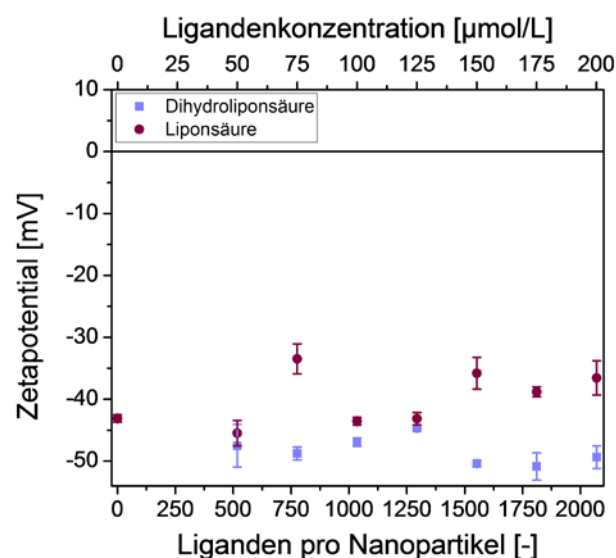


Abbildung 105: Einfluss der Disulfid- und Dithiol-Gruppen auf das Goldnanopartikel-Konjugat. Darstellung des Zetapotentials in Abhängigkeit der Anzahl an Liganden pro Nanopartikel.

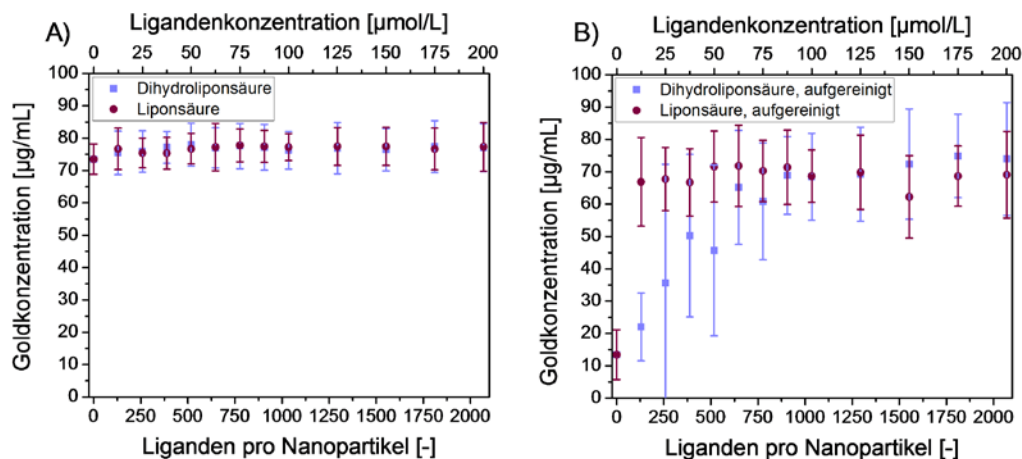


Abbildung 106: Einfluss der Disulfid- und Dithiol-Gruppen auf das Goldnanopartikel-Konjugat. Darstellung der Goldkonzentration von Liponsäure und Dihydroliponsäure in Abhängigkeit der Anzahl an Liganden pro Nanopartikel nach der Konjugation (A) und nach der Aufreinigung (B) der Konjugate.

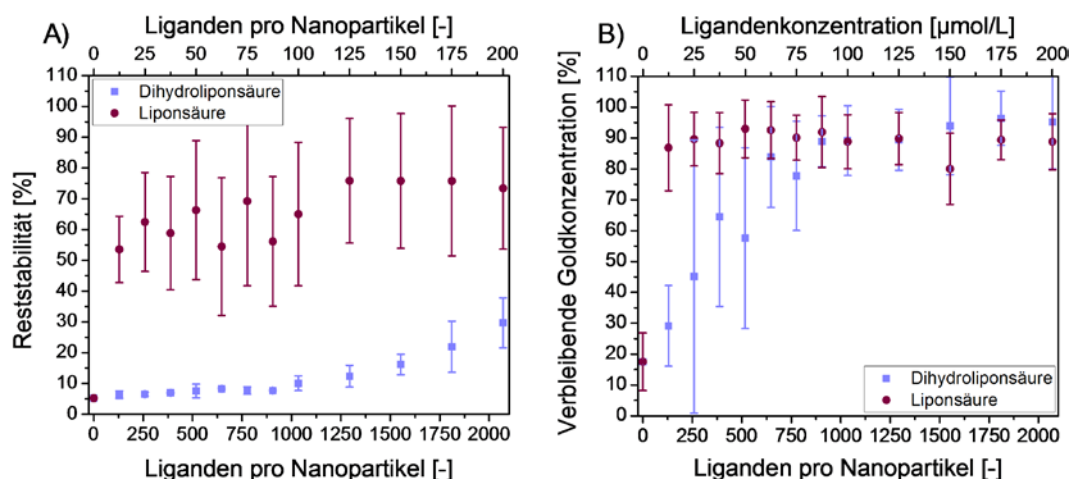


Abbildung 107: Einfluss der Disulfid- und Dithiol-Gruppen auf das Goldnanopartikel-Konjugat. Darstellung der Reststabilität (A) und der verbleibenden Goldkonzentration (B) in Abhängigkeit der Anzahl an Liganden pro Nanopartikel nach der Aufreinigung der Konjugate.

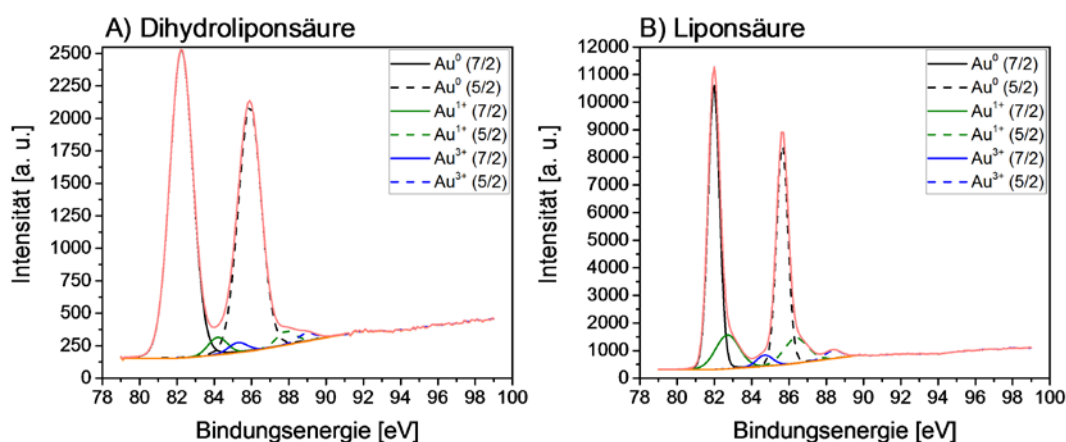


Abbildung 108: Darstellung der XPS-Spektren von Goldnanopartikel-Konjugaten mit Dihydroliponsäure (A) und Liponsäure (B).



Abbildung 109: Darstellung von Goldnanopartikel-Konjugaten mit verschiedenen Konzentrationen an Dihydroliponsäure und Liponsäure nach der Konjugation (Reihe 1 und 2) und nach der Aufreinigung (Reihe 3 und 4).

7.8.4. Einfluss von Peptiden auf Goldnanopartikel-Konjugate

Vergleich NLS mit und ohne Cystein

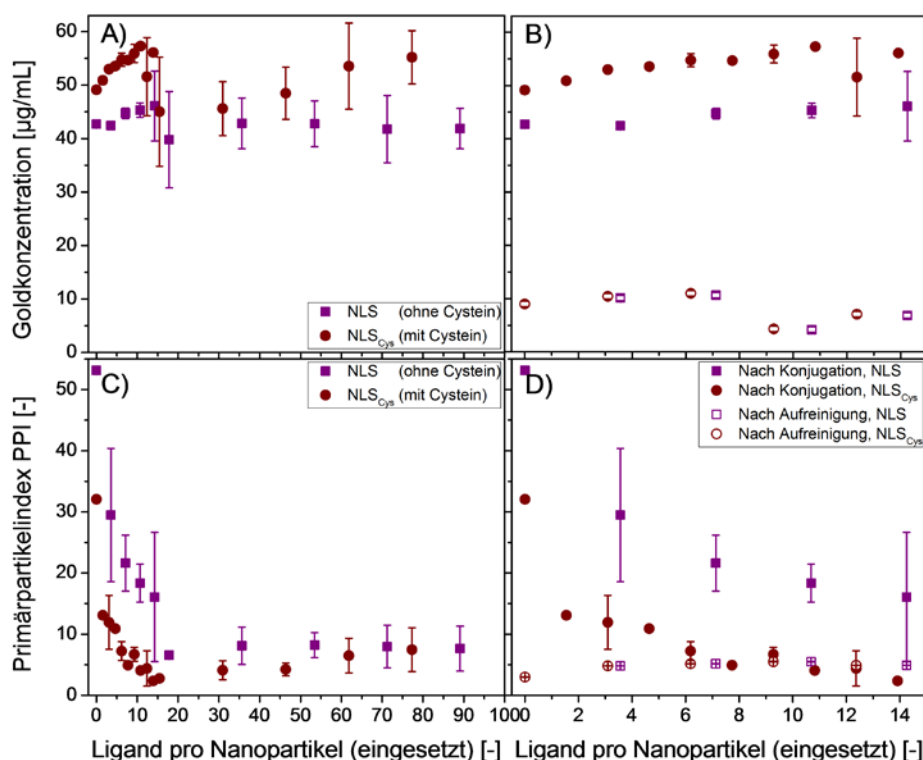


Abbildung 110: Stabilität von AuNP-NLS-Konjugaten unter Verwendung des Peptids mit und ohne thiolbindender Cystein-Endgruppe. Goldkonzentration (A, B) und Primärpartikelindex (C, D) der Konjugate in Abhängigkeit der eingesetzten Anzahl an Liganden pro Goldnanopartikel nach der Konjugation (A, C) in einem Bereich der Ligandendosis bis zu 90 Liganden/NP. Ein Vergleich der Proben nach der Konjugation und nach der Aufreinigung ist in einem kleineren Bereich der Ligandendosis bis zu 14 Liganden/NP dargestellt (B, D).

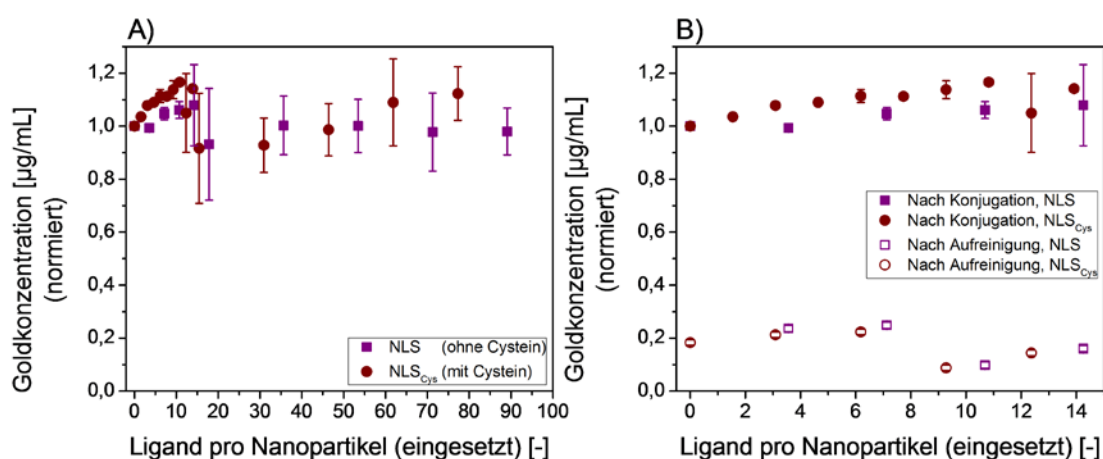


Abbildung 111: Stabilität von AuNP-NLS-Konjugaten unter Verwendung des Peptids mit und ohne thiolbindender Cystein-Endgruppe. Normierte Goldkonzentration der Konjugate in Abhängigkeit der eingesetzten Anzahl an Liganden pro Goldnanopartikel nach der Konjugation in einem Bereich der Ligandendosis bis zu 90 Liganden/NP. (A) Ein Vergleich der Proben nach der Konjugation und nach der Aufreinigung ist in einem kleineren Bereich der Ligandendosis bis zu 14 Liganden/NP dargestellt (B).

Vergleich Peptide verschiedener Art

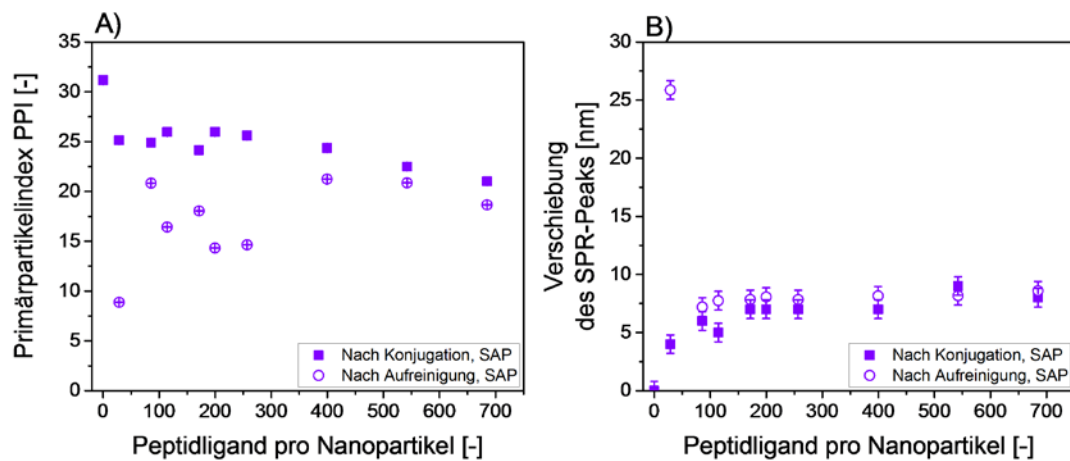


Abbildung 112: Darstellung des Primärpartikelindex PPI (A) und der Verschiebung des SPR-Peaks (B) in Abhängigkeit der eingesetzten Ligandendosis für AuNP-SAP-Konjugate nach der Konjugation und nach der Aufreinigung.

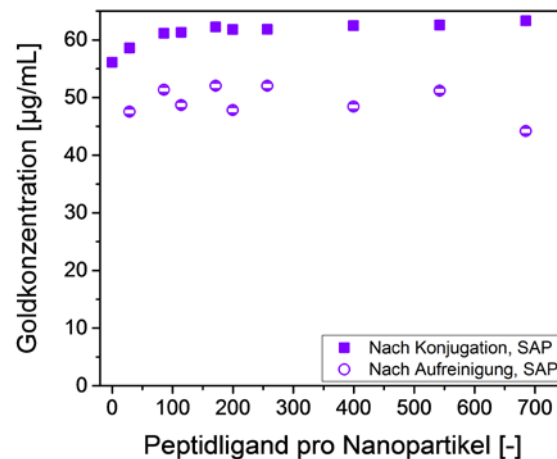


Abbildung 113: Darstellung der Goldkonzentration in Abhängigkeit der eingesetzten Ligandendosis für AuNP-SAP-Konjugate nach der Konjugation und nach der Aufreinigung.

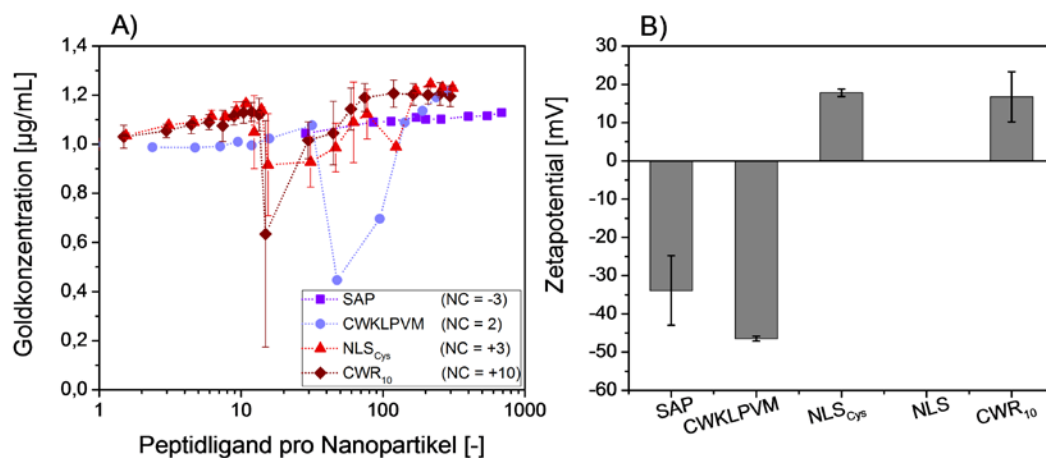


Abbildung 114: Darstellung der Goldkonzentration (A) in Abhängigkeit der eingesetzten Anzahl an Liganden pro Nanopartikel und des Zetapotentials (B) von Konjugaten mit verschiedenen Peptiden.

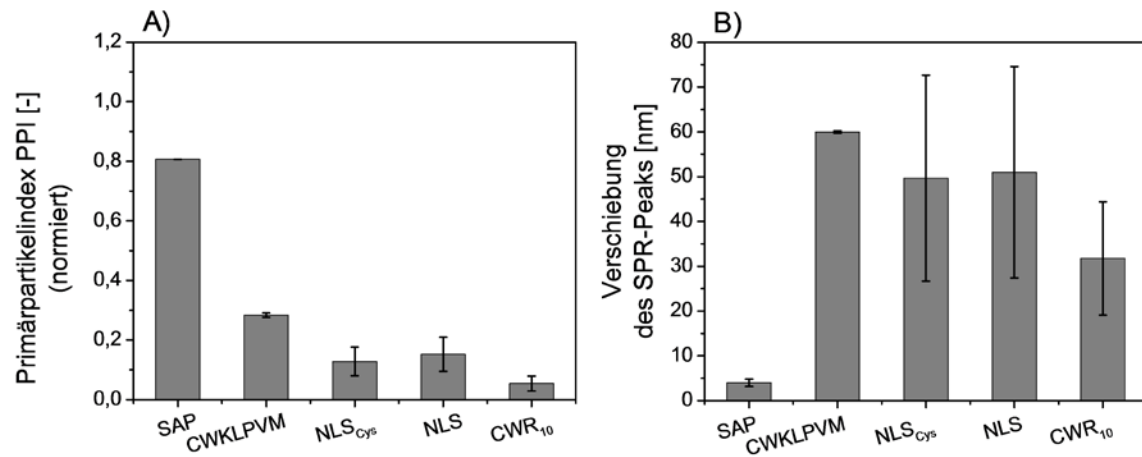


Abbildung 115: Darstellung des normierten Primärpartikelindex PPI (A) und der Verschiebung des SPR-Peaks von Konjugaten mit verschiedenen Peptiden.

7.8.5. Methoden zur Aufreinigung und Bestimmung der Oberflächenbeladung von Biokonjugaten

Aufreinigung mittels Gelelektrophorese

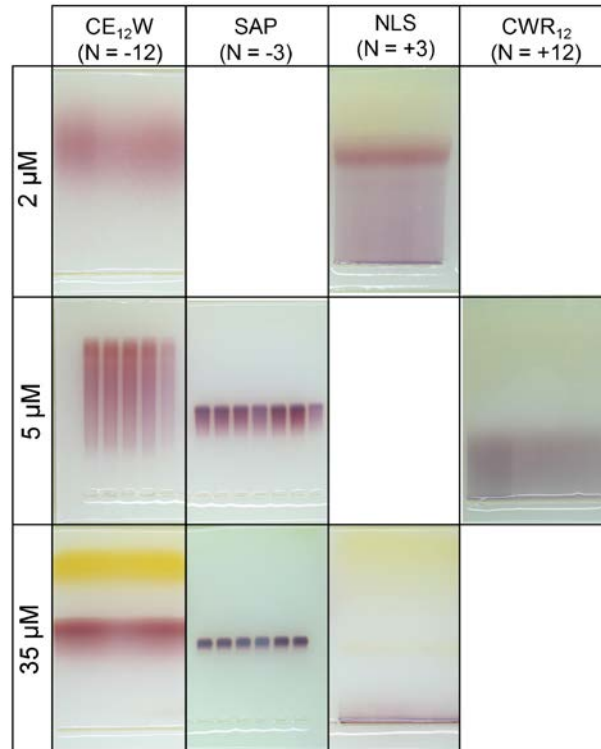


Abbildung 116: AuNP-CE₁₂W-, AuNP-SAP-, AuNP-NLS_{Cys}- und AuNP-CWR₁₂-Konjugate mit verschiedenen Peptidkonzentrationen, welche in Agarose-Gelen während der Gelelektrophorese gelaufen sind.

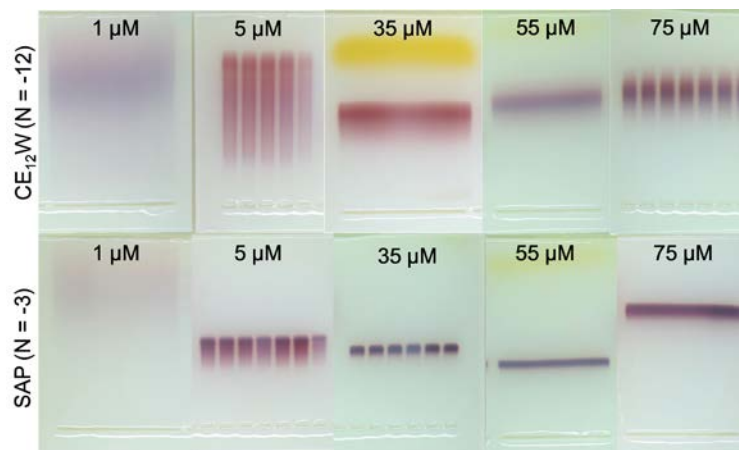


Abbildung 117: AuNP-CE₁₂W- und AuNP-SAP-Konjugate mit verschiedenen Peptidkonzentrationen, welche in Agarose-Gelen während der Gelelektrophorese gelaufen sind.

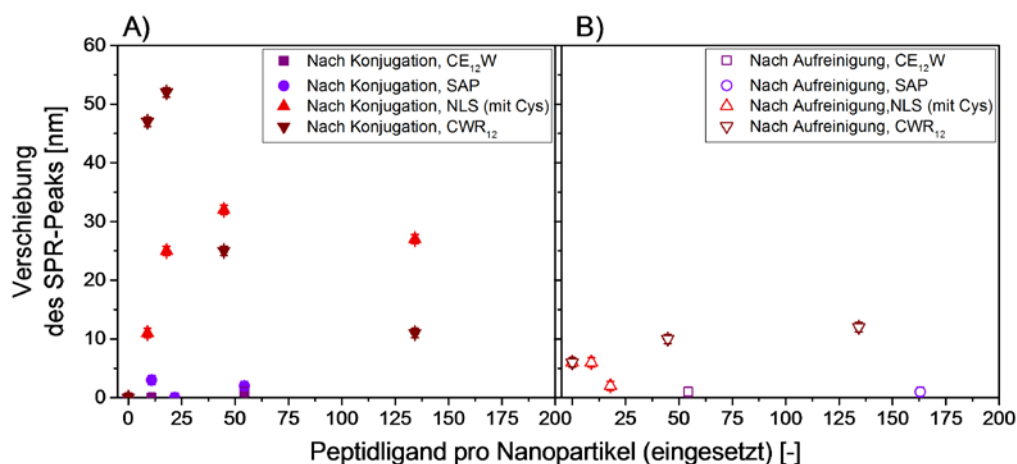


Abbildung 118: Darstellung der Verschiebung des SPR-Peaks in Abhängigkeit der eingesetzten Ligandendosis pro Nanopartikel für AuNP-CE₁₂W-, AuNP-SAP-, AuNP-NLS_{Cys}- und AuNP-CWR₁₂-Konjugate nach der Konjugation (A) und nach der Aufreinigung (B).

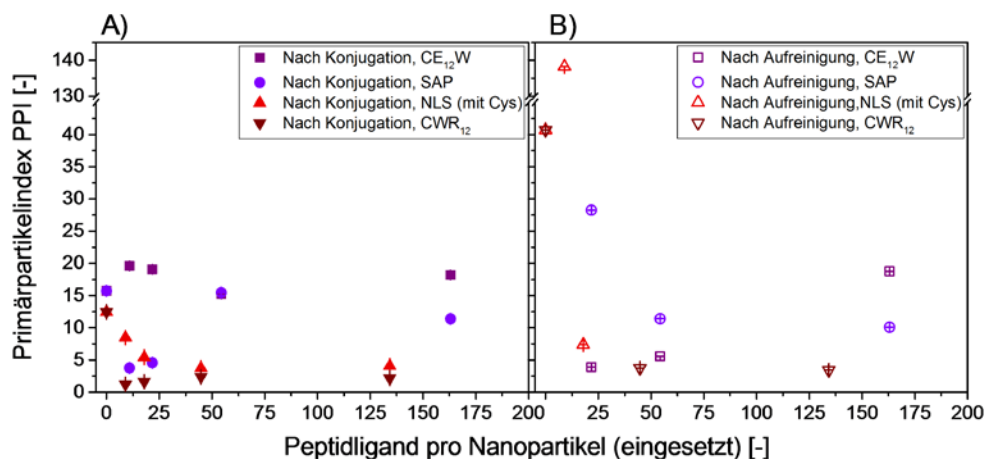


Abbildung 119: Darstellung des Primärpartikelindex in Abhängigkeit der eingesetzten Ligandendosis pro Nanopartikel für AuNP-CE₁₂W-, AuNP-SAP-, AuNP-NLS_{Cys}- und AuNP-CWR₁₂-Konjugate nach der Konjugation (A) und nach der Aufreinigung (B).

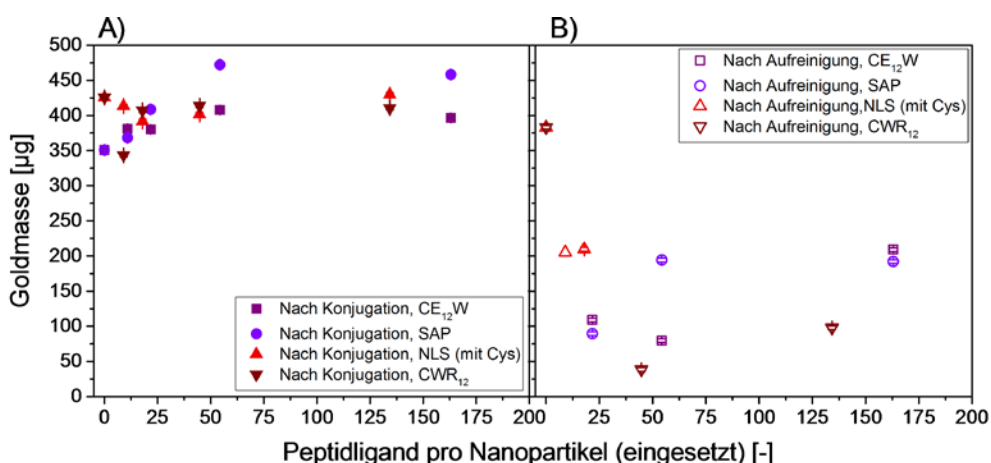


Abbildung 120: Darstellung der absoluten Goldmasse in Abhängigkeit der eingesetzten Ligandendosis pro Nanopartikel für AuNP-CE₁₂W-, AuNP-SAP-, AuNP-NLS_{Cys}- und AuNP-CWR₁₂-Konjugate nach der Konjugation (A) und nach der Aufreinigung (B).

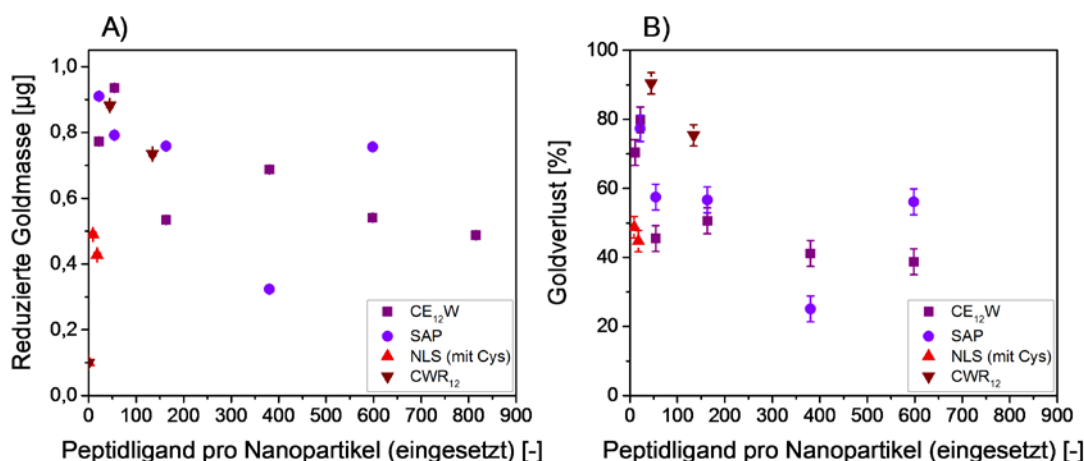


Abbildung 121: Darstellung der reduzierten absoluten Goldmasse (A) und des prozentualen Goldverlusts (B) in Abhängigkeit der eingesetzten Ligandendosis pro Nanopartikel für AuNP- CE_{12}W -, AuNP-SAP-, AuNP-NLS_{Cys}- und AuNP-CWR₁₂-Konjugate nach der Aufreinigung.

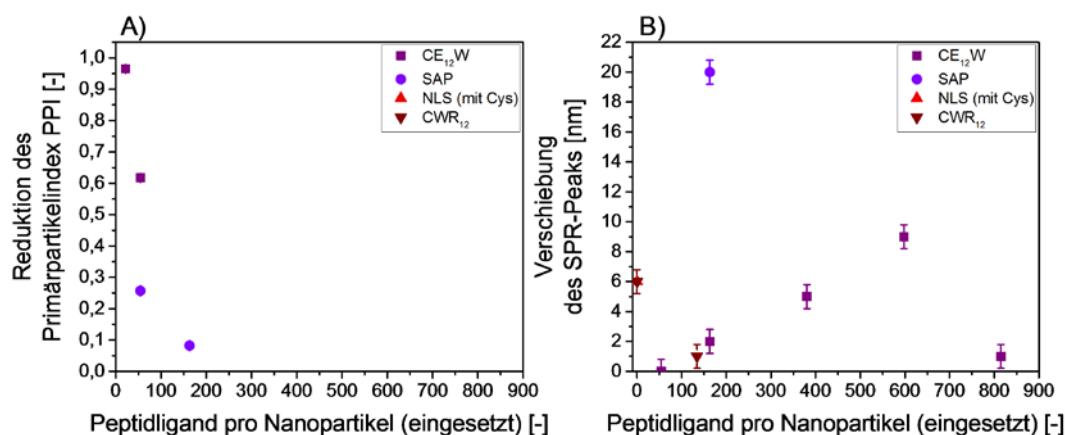


Abbildung 122: Darstellung des reduzierten Primärpartikelindex (A) und der Verschiebung des SPR-Peaks (B) in Abhängigkeit der eingesetzten Ligandendosis pro Nanopartikel für AuNP- CE_{12}W -, AuNP-SAP-, AuNP-NLS_{Cys}- und AuNP-CWR₁₂-Konjugate nach der Aufreinigung.

Aufreinigung mittels Zentrifugalfiltration

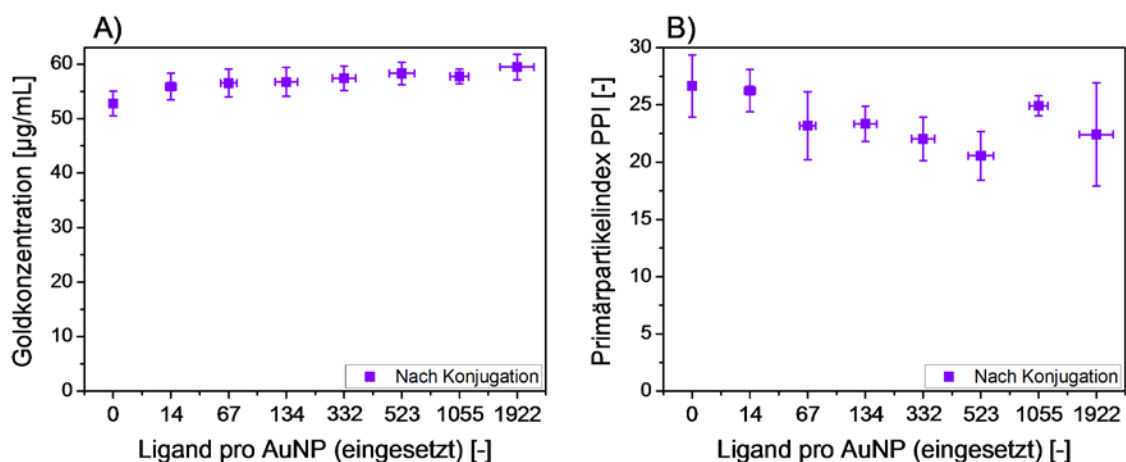


Abbildung 123: Darstellung der Goldkonzentration (A) und des Primärpartikelindex PPI (B) in Abhängigkeit der eingesetzten Menge an Liganden von AuNP- CE_{12}W -Konjugaten nach der Konjugation.

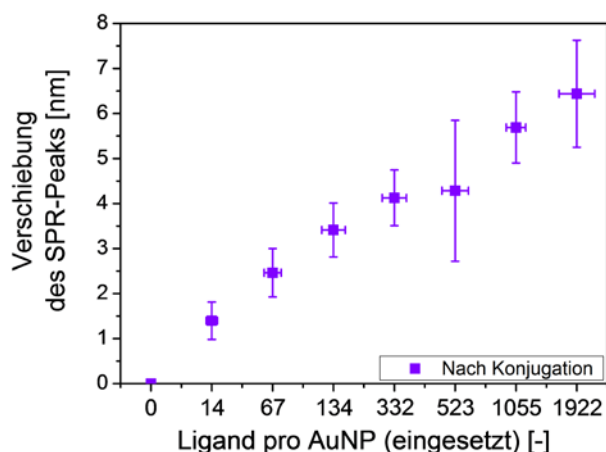


Abbildung 124: Darstellung der Verschiebung des SPR-Peaks in Abhängigkeit der eingesetzten Menge an Liganden von AuNP-CE₁₂W-Konjugaten nach der Konjugation.

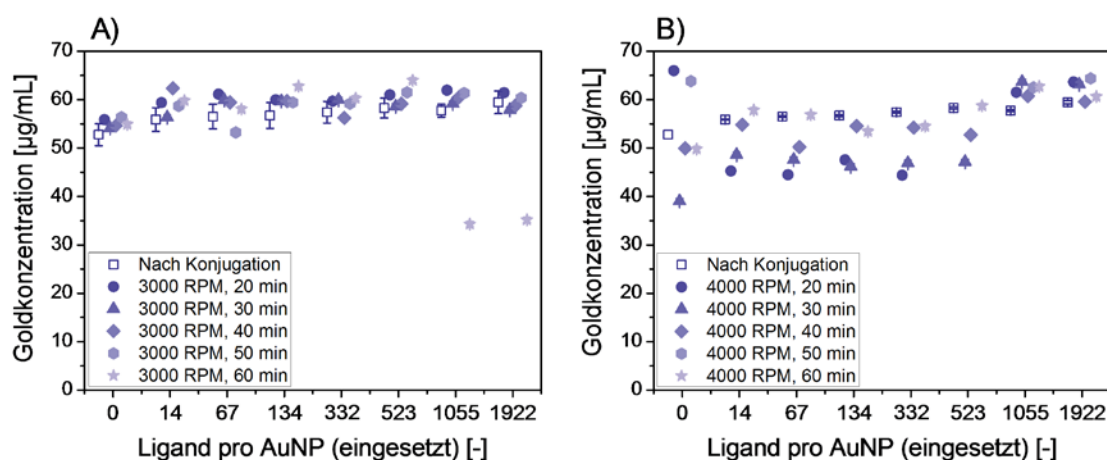


Abbildung 125: Stabilität der Konjugate bei der Zentrifugalfiltration. Goldkonzentration der AuNP-CE₁₂W-Konjugate vor und nach der Aufreinigung bei verschiedenen Zentrifugationszeiten von 20 min, 30 min, 40 min, 50 min und 60 min mit einer Geschwindigkeit von 3000 RPM (A) und 4000 RPM (B).

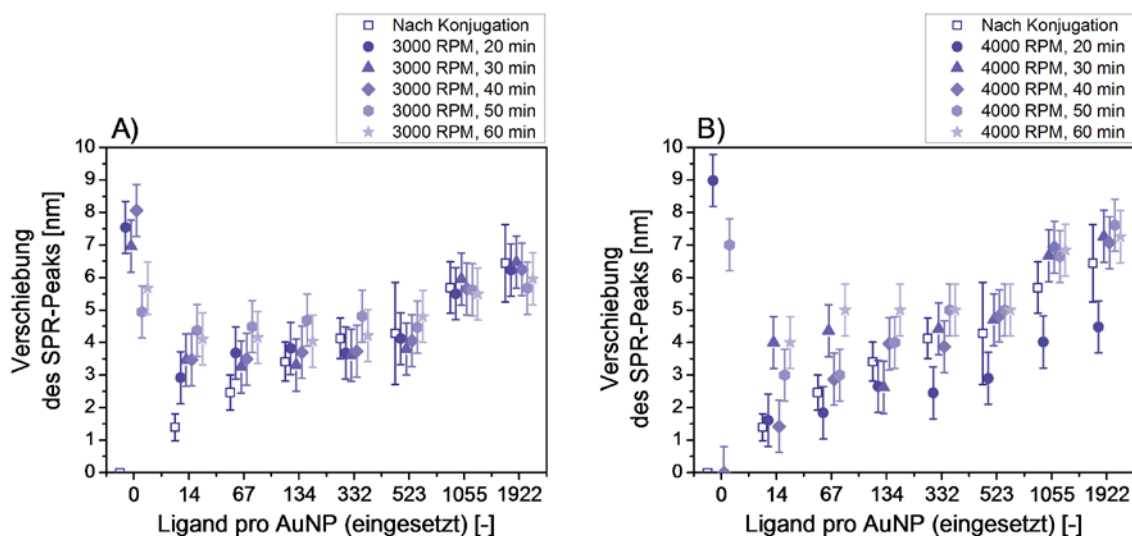


Abbildung 126: Stabilität der Konjugate bei der Zentrifugalfiltration. Verschiebung des SPR-Peaks der AuNP-CE₁₂W-Konjugate vor und nach der Aufreinigung bei verschiedenen Zentrifugationszeiten von 20 min, 30 min, 40 min, 50 min und 60 min mit einer Geschwindigkeit von 3000 RPM (A) und 4000 RPM (B).

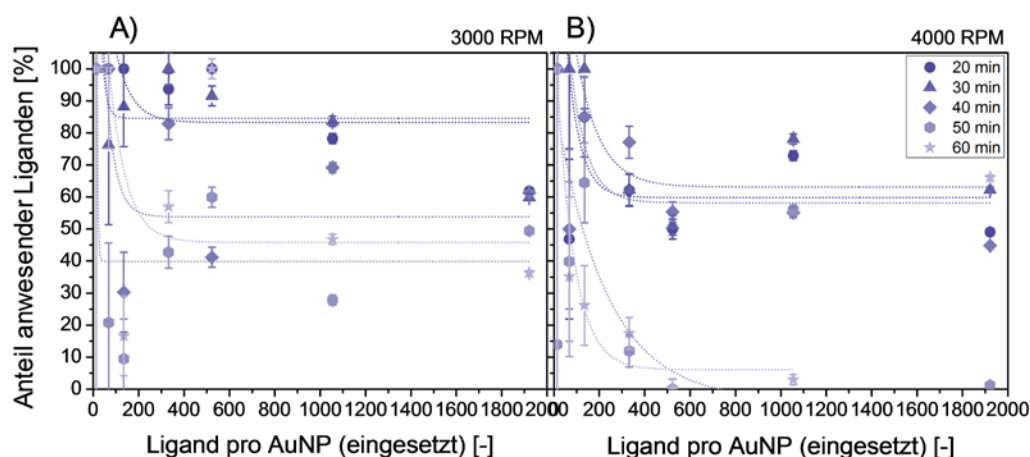


Abbildung 127: Darstellung der Konjugationseffizienz der AuNP-CE₁₂W-Konjugate nach der Aufreinigung bei verschiedenen Zentrifugationszeiten von 20 min, 30 min, 40 min, 50 min und 60 min mit einer Geschwindigkeit von 3000 RPM (A) und 4000 RPM (B).

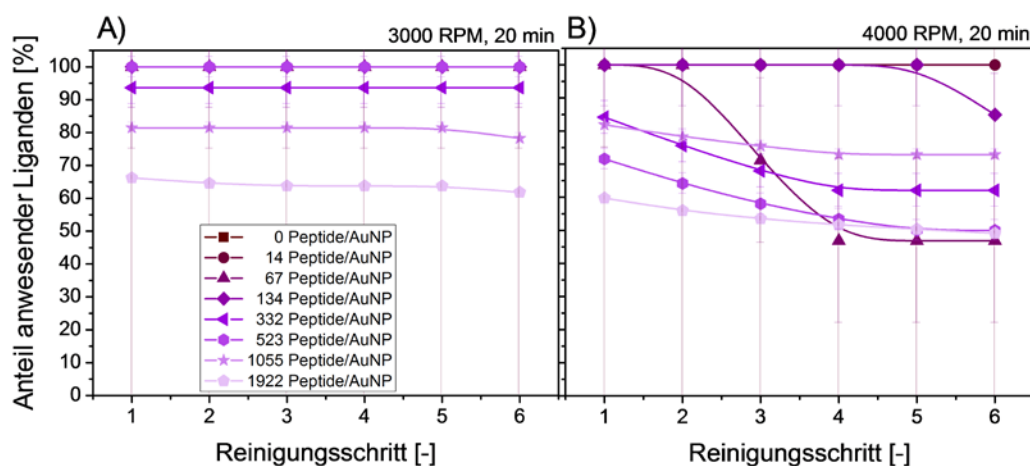


Abbildung 128: Darstellung der Konjugationseffizienz der AuNP-CE₁₂W-Konjugate in Abhängigkeit der Anzahl an Reinigungsschritten nach der Aufreinigung bei verschiedenen eingesetzten Ligandendosen von 0 – 1922 Peptiden/AuNP mit einer Zentrifugationsdauer von 20 min und einer Geschwindigkeit von 3000 RPM (A) und 4000 RPM (B).

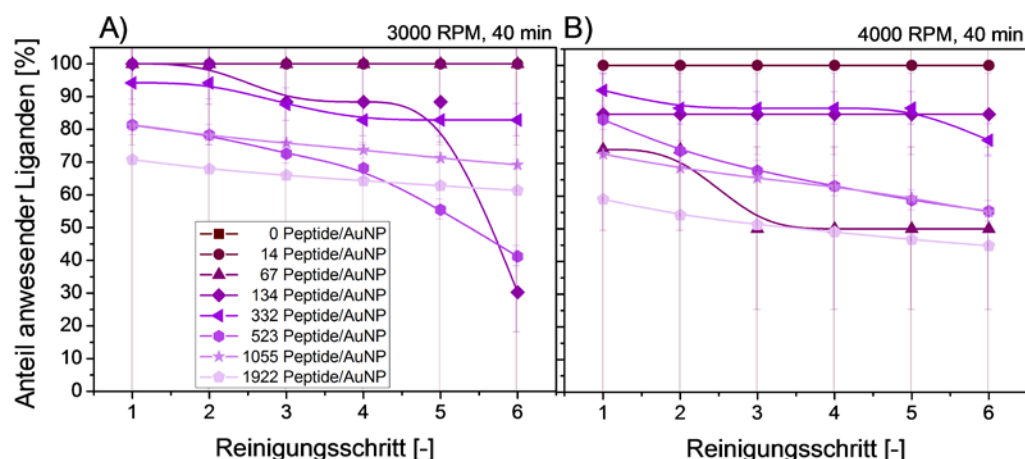


Abbildung 129: Darstellung der Konjugationseffizienz der AuNP-CE₁₂W-Konjugate in Abhängigkeit der Anzahl an Reinigungsschritten nach der Aufreinigung bei verschiedenen eingesetzten Ligandendosen von 0 – 1922 Peptiden/AuNP mit einer Zentrifugationsdauer von 40 min und einer Geschwindigkeit von 3000 RPM (A) und 4000 RPM (B).

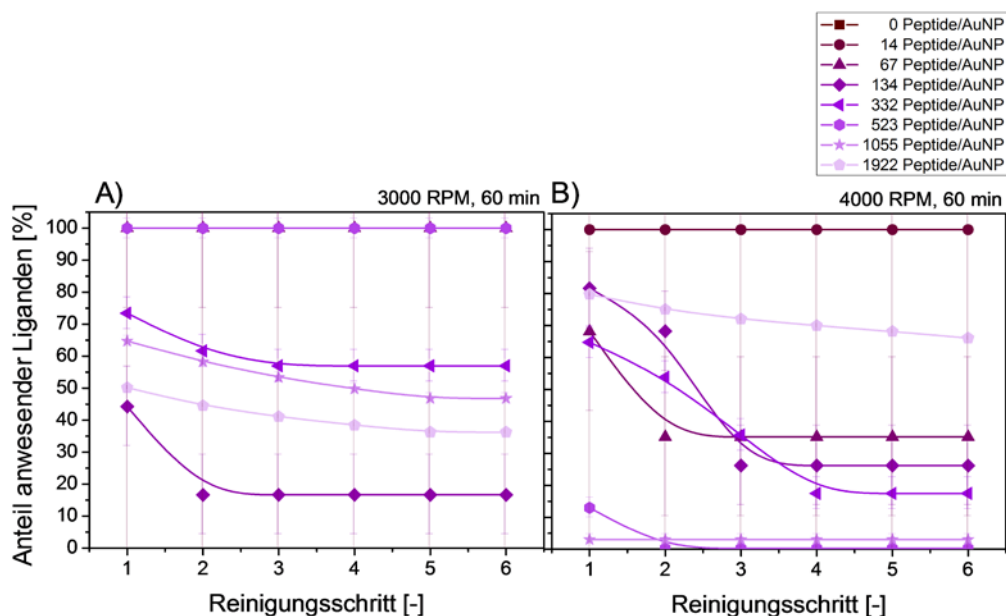


Abbildung 130: Darstellung der Konjugationseffizienz der AuNP-CE₁₂W-Konjugate in Abhängigkeit der Anzahl an Reinigungsschritten nach der Aufreinigung bei verschiedenen eingesetzten Ligandendosen von 0 – 1922 Peptiden/AuNP mit einer Zentrifugationsdauer von 60 min und einer Geschwindigkeit von 3000 RPM (A) und 4000 RPM (B).

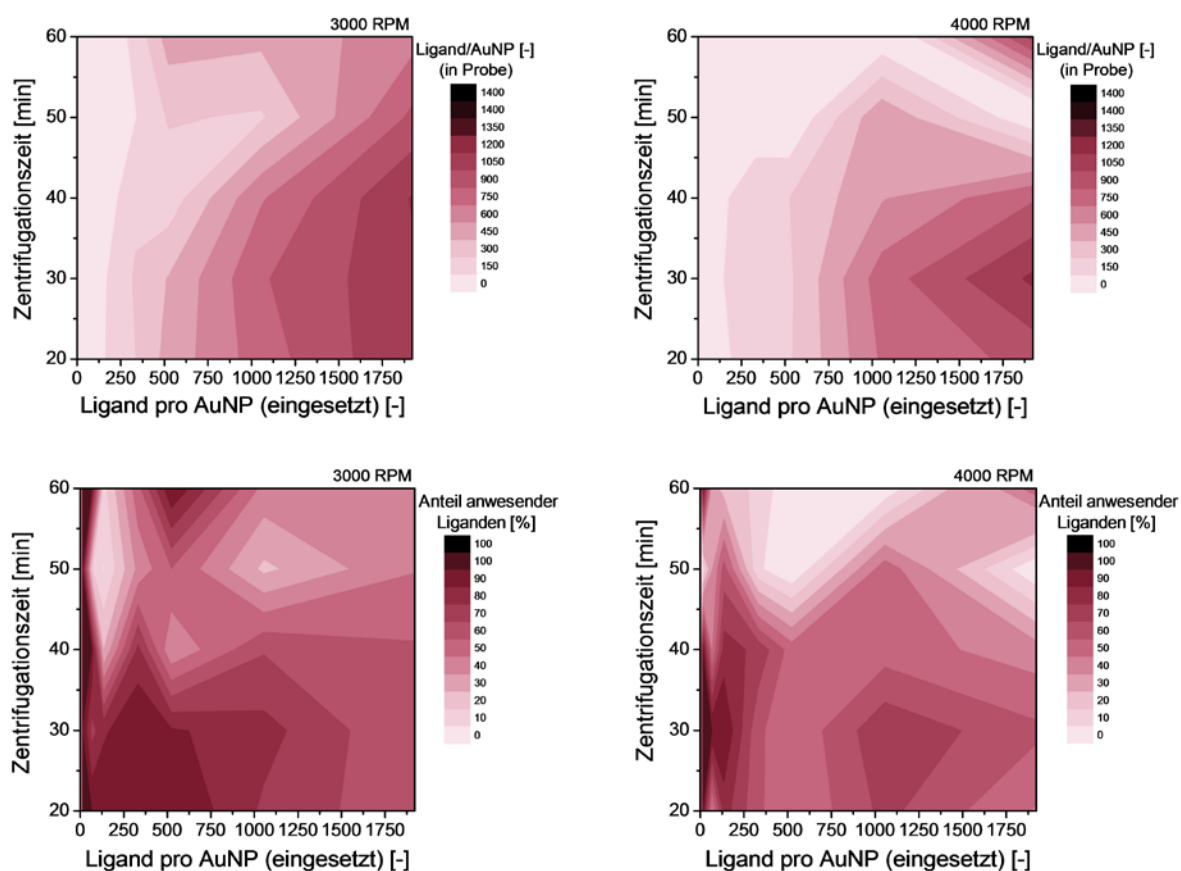


Abbildung 131: Darstellung der Oberflächenbeladung der AuNP-CE₁₂W-Konjugate in Abhängigkeit der Zentrifugationsdauer und der eingesetzten Ligandendosis für eine Zentrifugationsgeschwindigkeit von 3000 RPM (oben links) und 4000 RPM (oben rechts). Darstellung der Konjugationseffizienz der AuNP-CE₁₂W-Konjugate in Abhängigkeit der Zentrifugationsdauer und der eingesetzten Ligandendosis für eine Zentrifugationsgeschwindigkeit von 3000 RPM (unten links) und 4000 RPM (unten rechts).

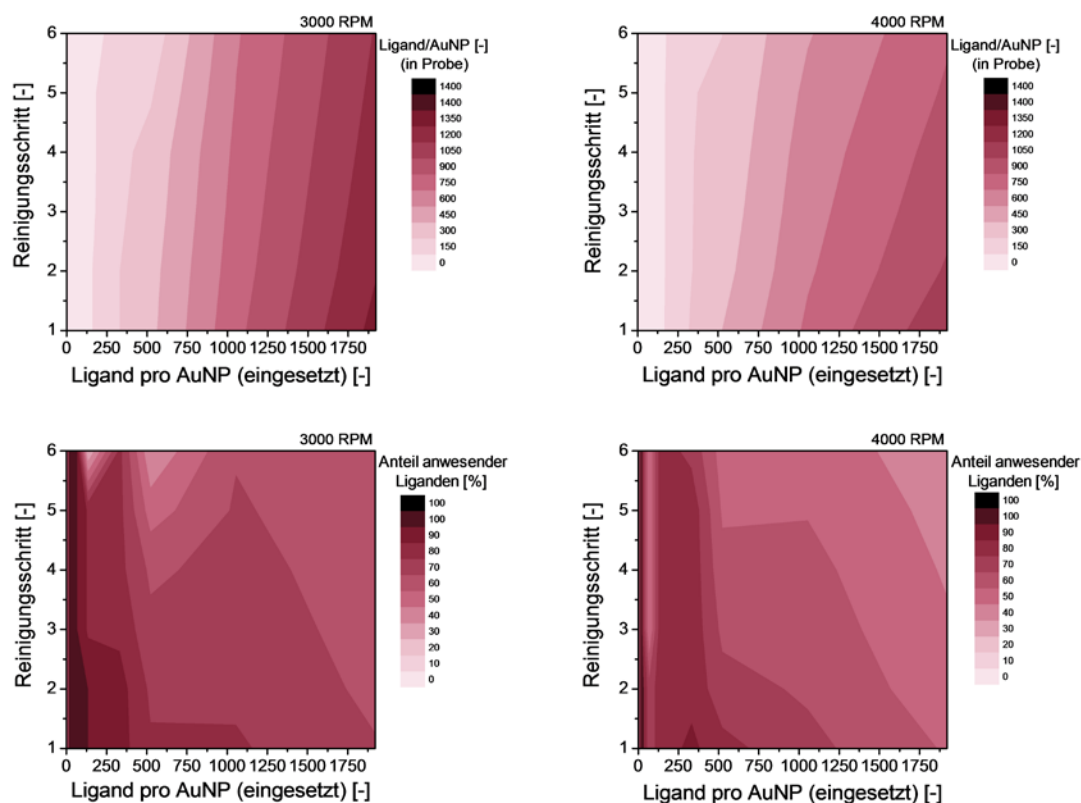


Abbildung 132: Darstellung der Oberflächenbeladung der AuNP-CE₁₂W-Konjugate in Abhängigkeit der Anzahl an Reinigungsschritten und der eingesetzten Ligandendosis für eine Zentrifugationsgeschwindigkeit von 3000 RPM (oben links) und 4000 RPM (oben rechts). Darstellung der Konjugationseffizienz der AuNP-CE₁₂W-Konjugate in Abhängigkeit der Anzahl an Reinigungsschritten und der eingesetzten Ligandendosis für eine Zentrifugationsgeschwindigkeit von 3000 RPM (unten links) und 4000 RPM (unten rechts).

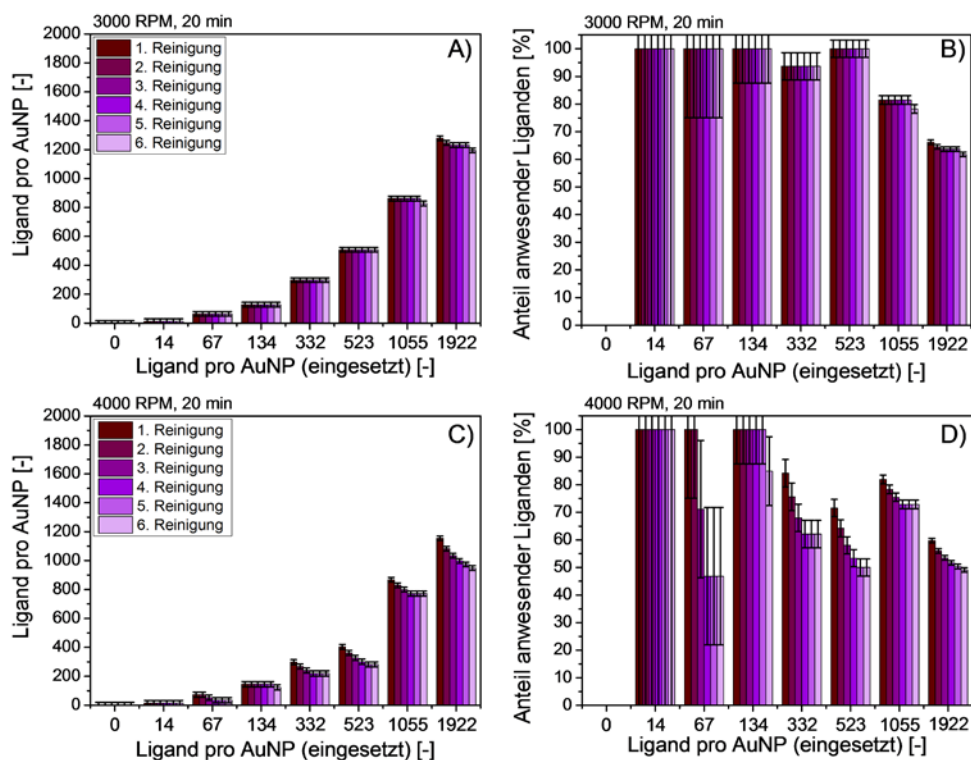


Abbildung 133: Darstellung der Oberflächenbeladung der AuNP-CE₁₂W-Konjugate (A, C) und der Konjugationseffizienz (B, D) in Abhängigkeit der eingesetzten Ligandendosis für 1 – 6 Reinigungsschritte für eine Zentrifugationsdauer von 20 Minuten und eine Zentrifugationsgeschwindigkeit von 3000 RPM (A, B) und 4000 RPM (C, D).

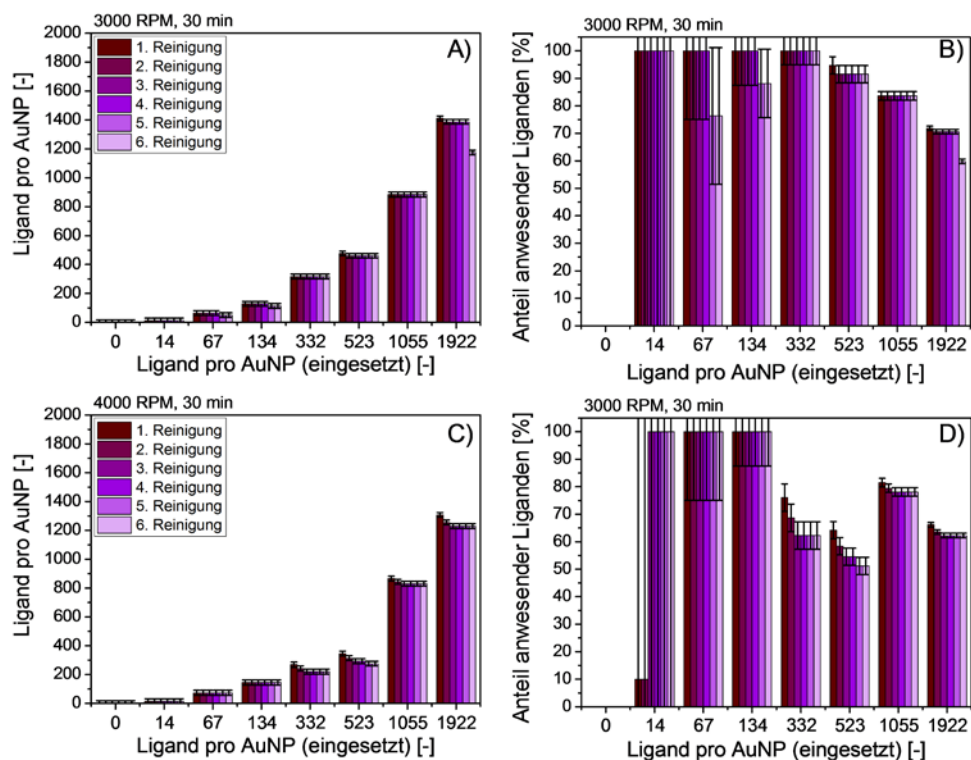


Abbildung 134: Darstellung der Oberflächenbeladung der AuNP-CE₁₂W-Konjugate (A, C) und der Konjugationseffizienz (B, D) in Abhängigkeit der eingesetzten Ligandendosis für 1 – 6 Reinigungsschritte für eine Zentrifugationsdauer von 30 Minuten und eine Zentrifugationsgeschwindigkeit von 3000 RPM (A, B) und 4000 RPM (C, D)

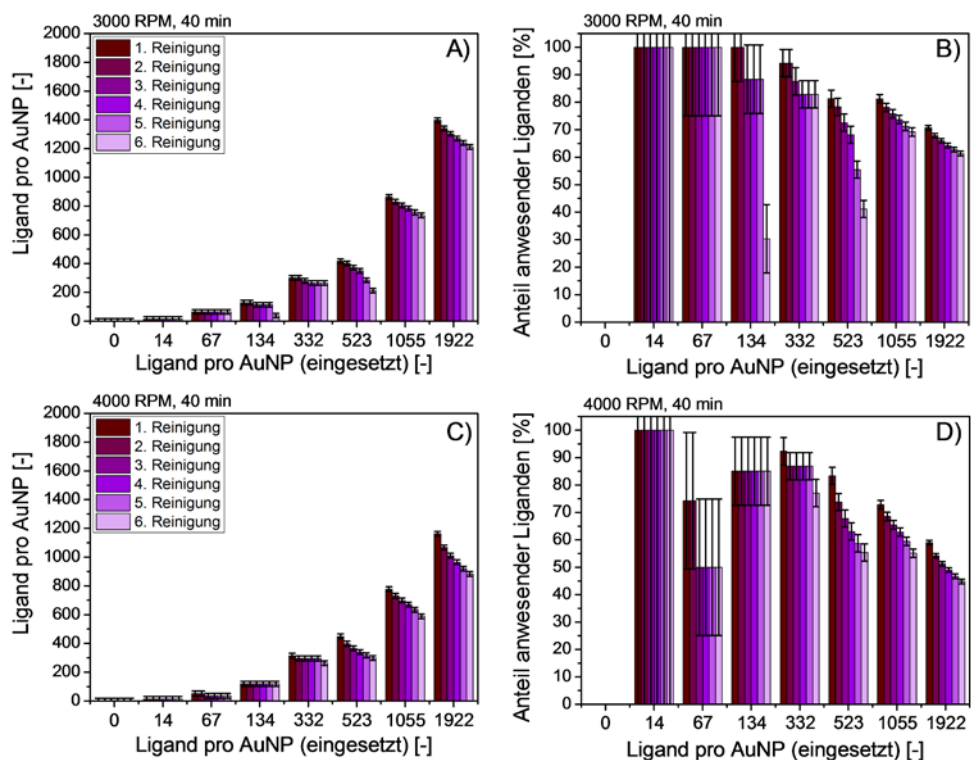


Abbildung 135: Darstellung der Oberflächenbeladung der AuNP-CE₁₂W-Konjugate (A, C) und der Konjugationseffizienz (B, D) in Abhängigkeit der eingesetzten Ligandendosis für 1 – 6 Reinigungsschritte für eine Zentrifugationsdauer von 40 Minuten und eine Zentrifugationsgeschwindigkeit von 3000 RPM (A, B) und 4000 RPM (C, D)

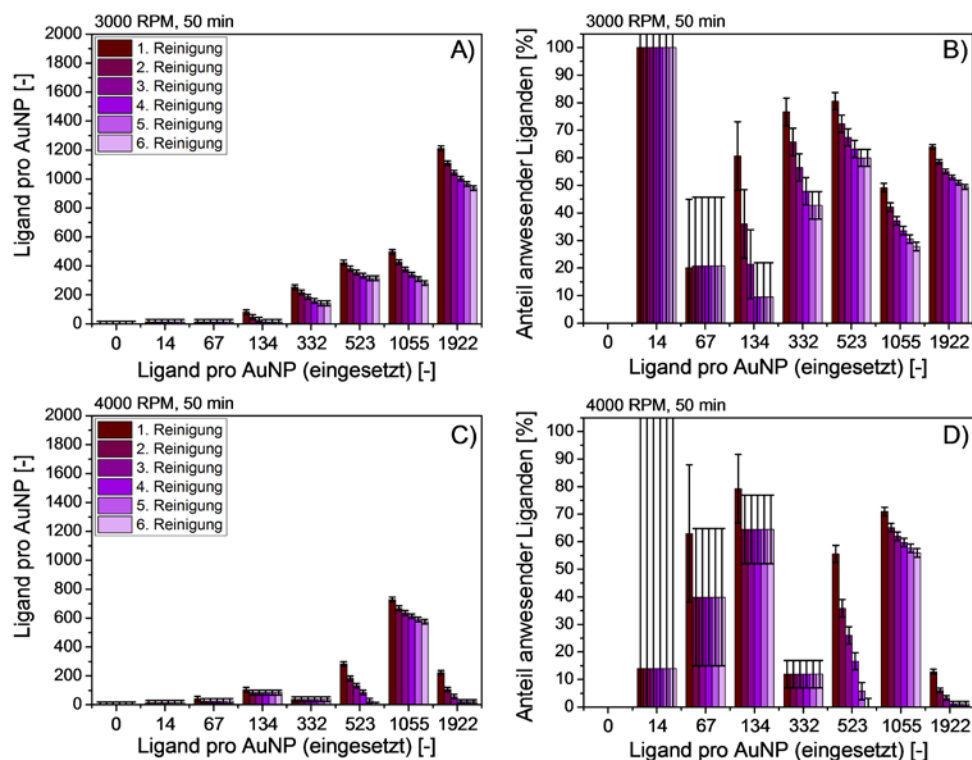


Abbildung 136: Darstellung der Oberflächenbeladung der AuNP-CE₁₂W-Konjugate (A, C) und der Konjugationseffizienz (B, D) in Abhängigkeit der eingesetzten Ligandendosis für 1 – 6 Reinigungsschritte für eine Zentrifugationsdauer von 50 Minuten und eine Zentrifugationsgeschwindigkeit von 3000 RPM (A, B) und 4000 RPM (C, D)

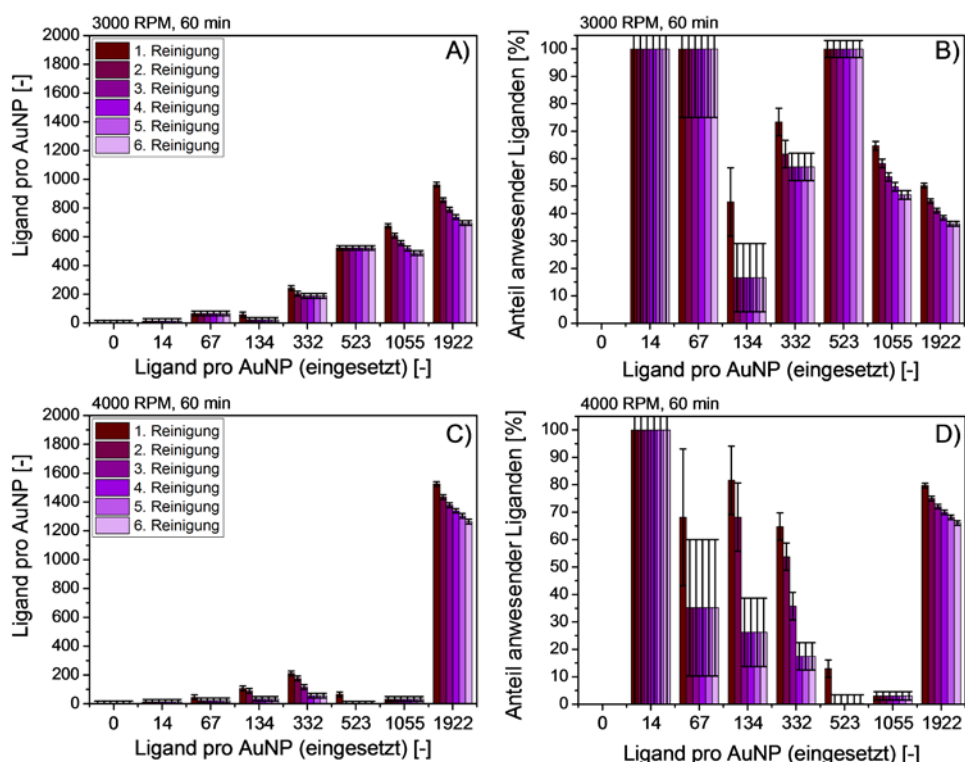


Abbildung 137: Darstellung der Oberflächenbeladung der AuNP-CE₁₂W-Konjugate (A, C) und der Konjugationseffizienz (B, D) in Abhängigkeit der eingesetzten Ligandendosis für 1 – 6 Reinigungsschritte für eine Zentrifugationsdauer von 60 Minuten und eine Zentrifugationsgeschwindigkeit von 3000 RPM (A, B) und 4000 RPM (C, D)

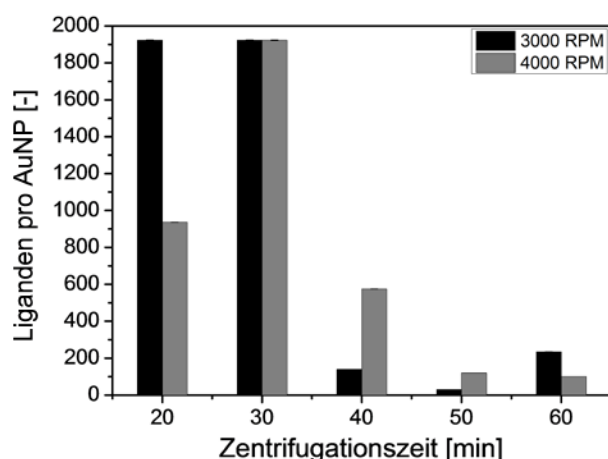


Abbildung 138: Darstellung der Oberflächenbeladung der AuNP-CE₁₂W-Konjugate in Abhängigkeit der Zentrifugationsdauer für eine Zentrifugationsgeschwindigkeit von 3000 RPM und 4000 RPM.

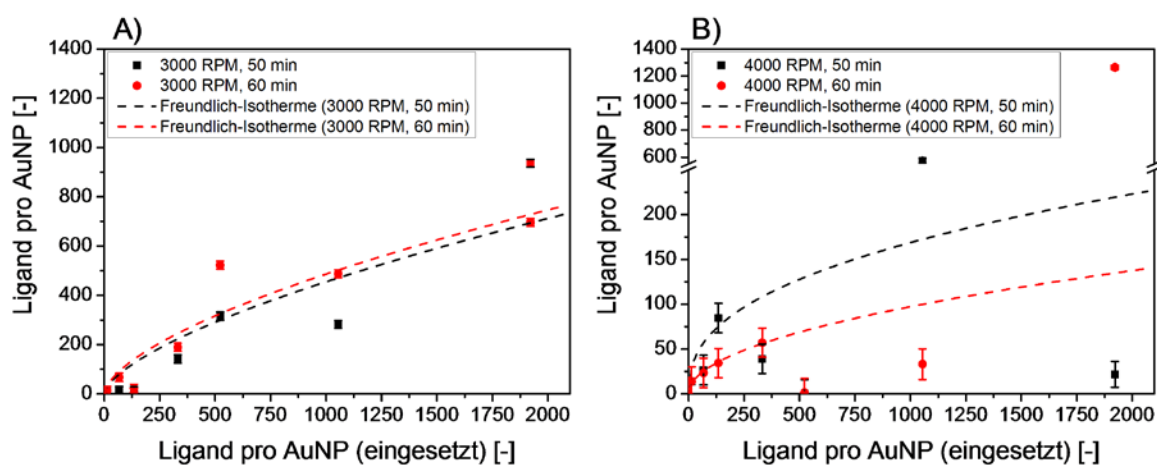


Abbildung 139: Darstellung der Freundlich-Isothermen für die Zentrifugalfiltration bei 3000 RPM (A) und 4000 RPM (B) nach einer Zentrifugationsdauer von 50 und 60 Minuten.

Tabelle 20: Parameter der verschiedenen Adsorptionsisothermen nach Anpassung der Messdaten der Zentrifugalfiltration für 3000 RPM und 4000 RPM bei einer Zentrifugationsdauer von 50 und 60 Minuten.

Isotherme	Parameter	3000 RPM 50 min	3000 RPM 60 min	4000 RPM 50 min	4000 RPM 60 min
Langmuir	qmax	364,67	285,73	108,60	32,36
	K	$-7,20 \cdot 10^{44}$	$1,96 \cdot 10^{45}$	$-2,01 \cdot 10^{42}$	$-4,63 \cdot 10^{45}$
	R ²	0,18	-0,01	-0,12	0,20
Freundlich	n	1,55	1,61	2,49	2,00
	K	5,22	6,73	10,49	3,08
	R ²	0,92	0,87	0,03	0,67
Temkin	K	-3451,36	-2703,28	-1030,82	-309,25
	R ²	-1,45	-0,93	-0,27	-1,56

Aufreinigung mittels Ultrazentrifugation

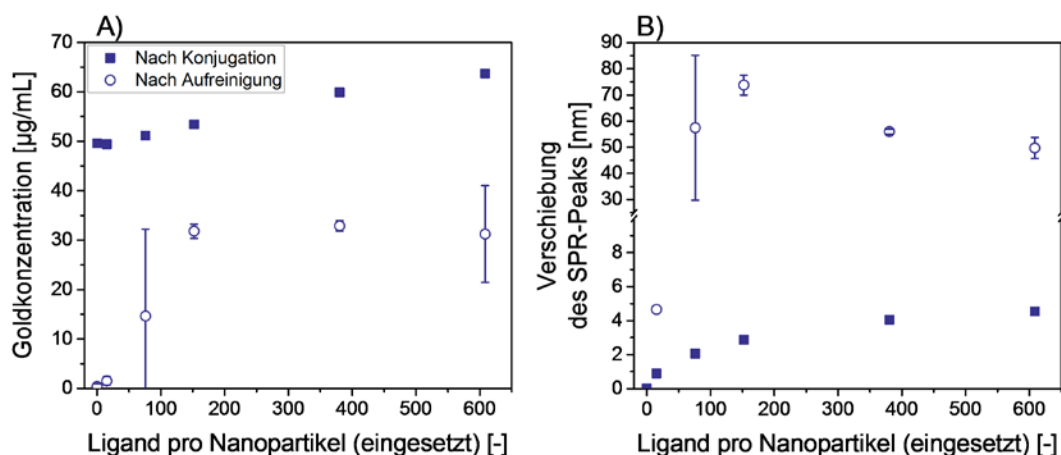


Abbildung 140: Aufreinigung von AuNP-CE₁₂W-Konjugaten mittels Ultrazentrifugation. Darstellung der Goldkonzentration (A) und der Verschiebung des SPR-Peaks (B) in Abhängigkeit der eingesetzten Ligandendosis von AuNP-CE₁₂W-Konjugaten nach der Konjugation und nach der Aufreinigung der Konjugate.

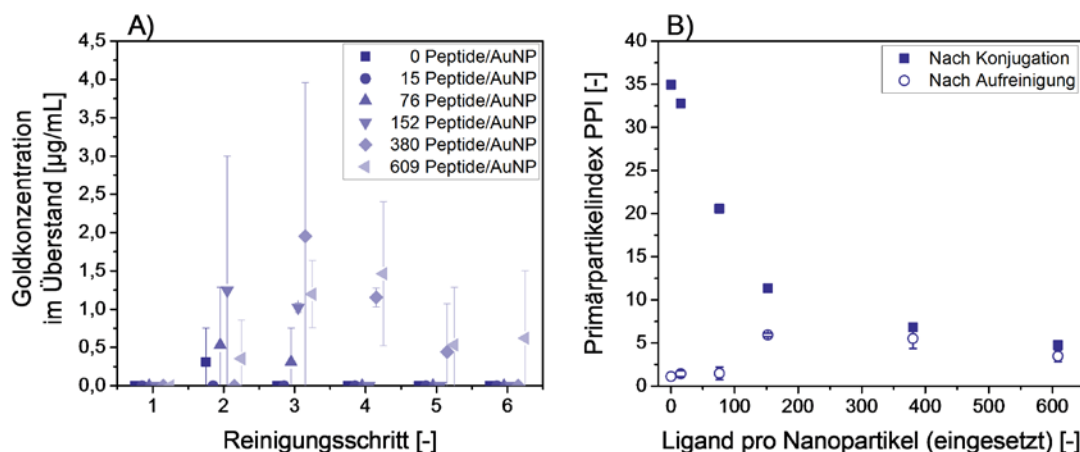


Abbildung 141: Aufreinigung von AuNP-CE₁₂W-Konjugaten mittels Ultrazentrifugation. Darstellung des Primärpartikelindex PPI in Abhängigkeit der eingesetzten Ligandendosis von AuNP-CE₁₂W-Konjugaten nach der Konjugation und nach der Aufreinigung der Konjugate. (B) Darstellung der Goldkonzentration im Überstand nach der Aufreinigung in Abhängigkeit der Anzahl an Reinigungsschritten für eine eingesetzte Ligandendosis von 0 – 609 Peptiden/AuNP.

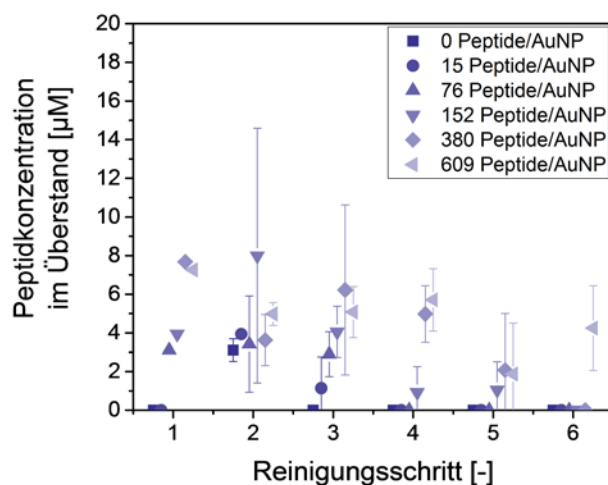


Abbildung 142: Aufreinigung von AuNP-CE₁₂W-Konjugaten mittels Ultrazentrifugation. Darstellung der Peptidkonzentration im Überstand nach der Aufreinigung in Abhängigkeit der Anzahl an Reinigungsschritten für eine eingesetzte Ligandendosis von 0 – 609 Peptiden/AuNP.

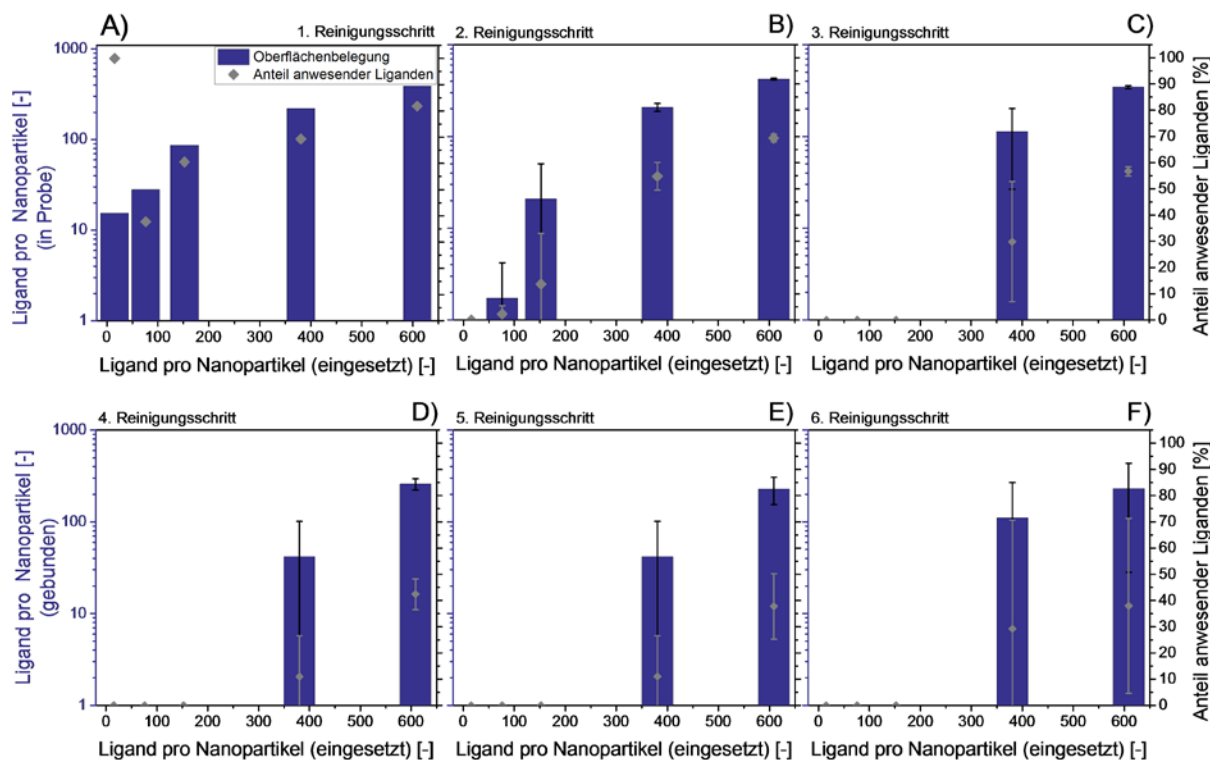


Abbildung 143: Darstellung der Oberflächenbelegung (linke Achse, Balken) und der Konjugationseffizienz (rechte Achse, Rauten) von AuNP-CE₁₂W-Konjugaten in Abhängigkeit der eingesetzten Ligandendosis für 1 – Reinigungsschritte.

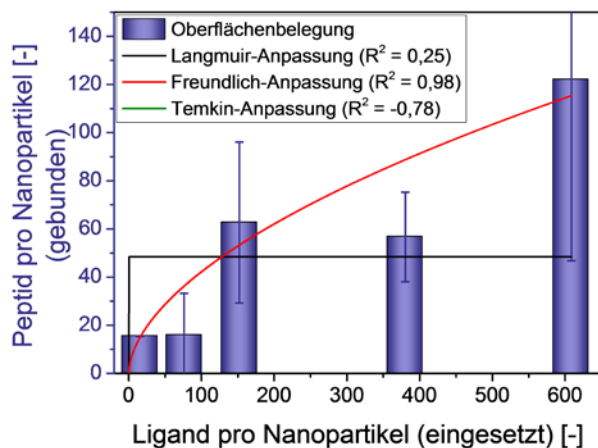


Abbildung 144: Darstellung der Langmuir-, Freundlich- und Temkin-Isothermen für die Aufreinigung mittels Ultrazentrifugation.

Tabelle 21: Parameter der verschiedenen Adsorptionsisothermen nach Anpassung der Messdaten aus der Aufreinigung von AuNP-CE₁₂W-Konjugaten mittels Ultrazentrifugation.

Isotherme	Parameter	Ultrazentrifugation
Langmuir	q _{max}	48,47
	K	$1,88 \cdot 10^{43}$
	R ²	0,25
Freundlich	n	1,80
	K	3,25
	R ²	0,98
Temkin	K	-461,56
	R ²	-0,78

Vergleich Peptide: Aufreinigung

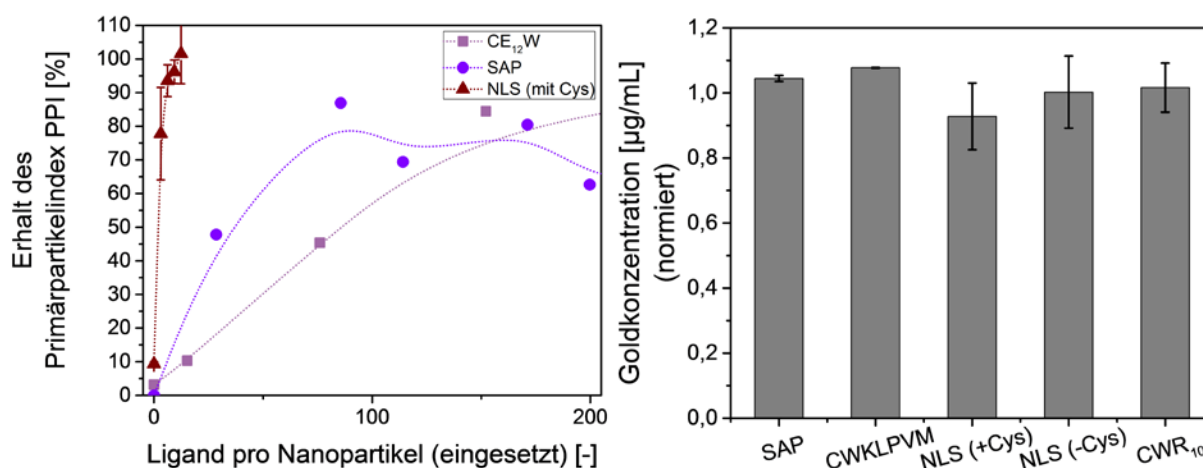


Abbildung 145: Darstellung des erhaltenen Primärpartikelindex in Abhängigkeit der eingesetzten Ligandendosis von Konjugaten bestehend aus verschiedenen Peptiden nach Aufreinigung mittels Ultrazentrifugation. (links) Darstellung der normierten Goldkonzentration von Konjugaten mit verschiedenen Peptiden. (rechts)

7.8.6. Einfluss von Oligonukleotiden auf Goldnanopartikel-Konjugate

Untersuchung der experimentellen Parameter der Inkubationszeit und des Salztyps

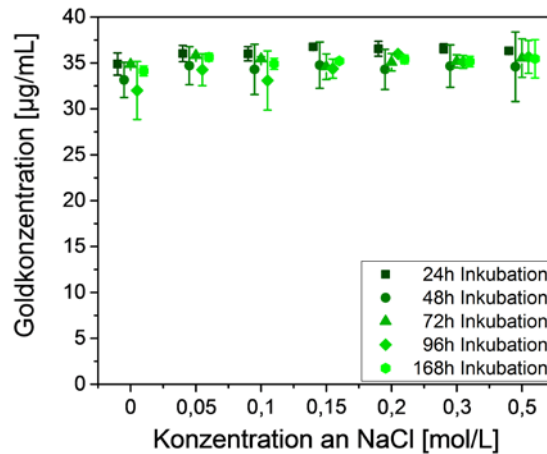


Abbildung 146: Stabilität der AuNP-5'LNA30T10-Konjugate dargestellt als Goldkonzentration in Abhängigkeit der Natriumchlorid-Konzentration (0 – 0,5 mol/L) und der Inkubationsdauer (24 – 168 h) nach der Konjugation.

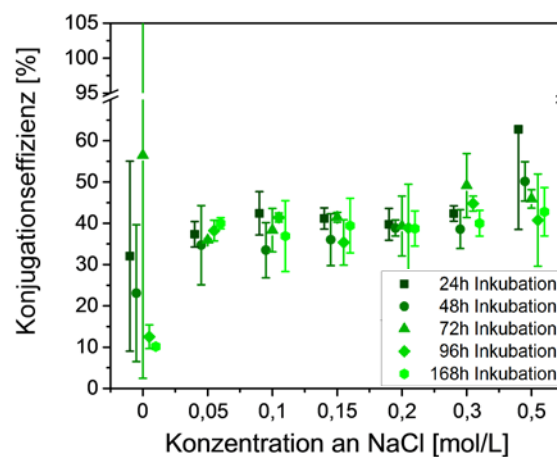


Abbildung 147: Oberflächenbelegung der AuNP-5'LNA30T10-Konjugate. Darstellung der Konjugationseffizienz in Abhängigkeit der Natriumchlorid-Konzentration (0 – 0,5 mol/L) und der Inkubationsdauer (24 – 168 h) nach der Aufreinigung mittels Ultrazentrifugation.

5'DNA_{CT26T10}

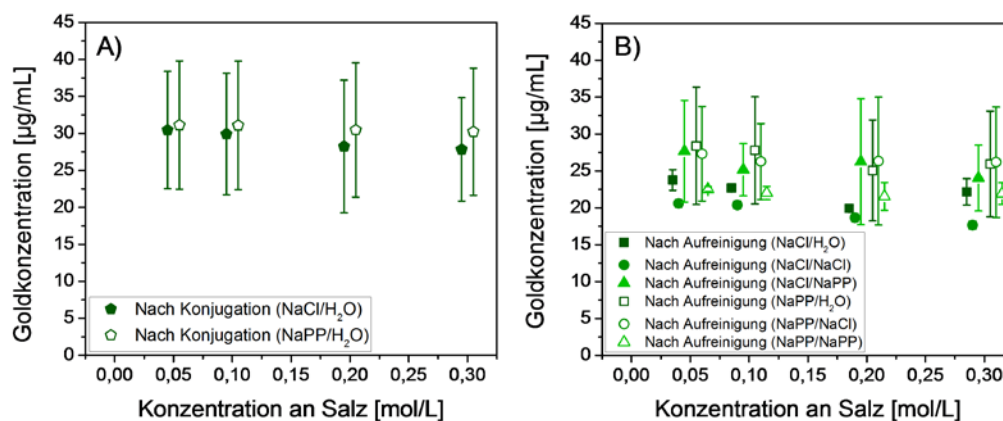


Abbildung 148: Stabilität der AuNP-Oligonukleotid-Konjugate. Darstellung der Goldkonzentration für Konjugate aus 5'DNA_{CT26T10} (1,3 µM) in Abhängigkeit der NaCl- und NaPP-Konzentration vor und nach der Aufreinigung mittels Ultrazentrifugation.

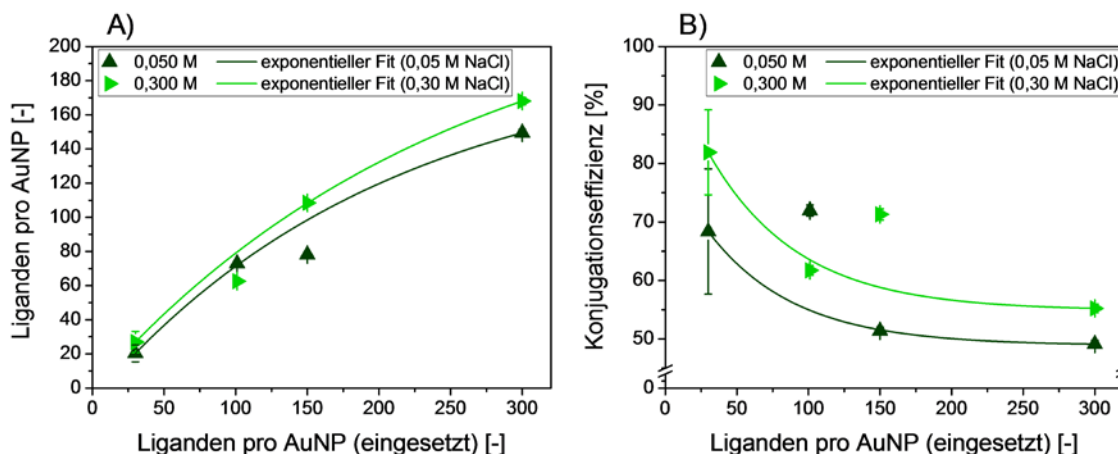


Abbildung 149: Oberflächenbelegung der AuNP-5'DNA_{CT26T10}-Konjugate. Darstellung der Anzahl an Liganden pro AuNP (A) und der Konjugationseffizienz (B) in Abhängigkeit der eingesetzten Ligandenkonzentration nach der Aufreinigung mittels Ultrazentrifugation.

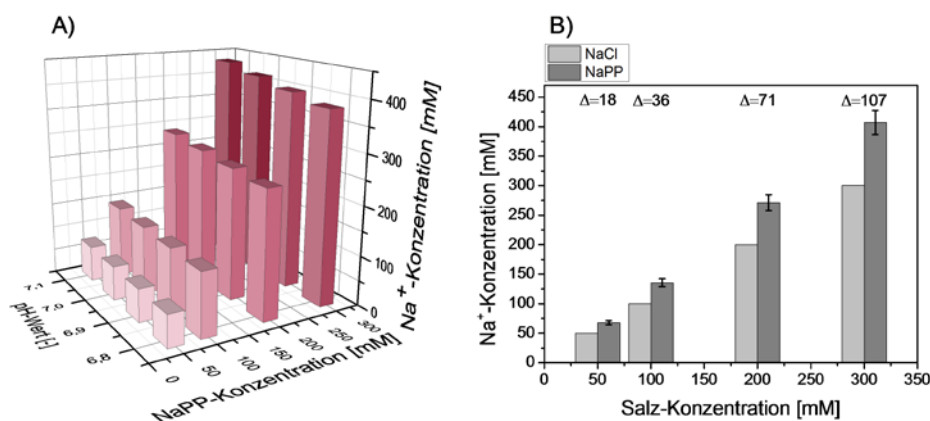


Abbildung 150: Darstellung der eingesetzten Na⁺-Konzentration in Abhängigkeit der NaPP-Konzentration und des pH-Wertes. (A) Darstellung der eingesetzten Na⁺-Konzentration in Abhängigkeit der Salzkonzentration für NaCl und NaPP.

Variation der einzusetzenden Menge an Liganden

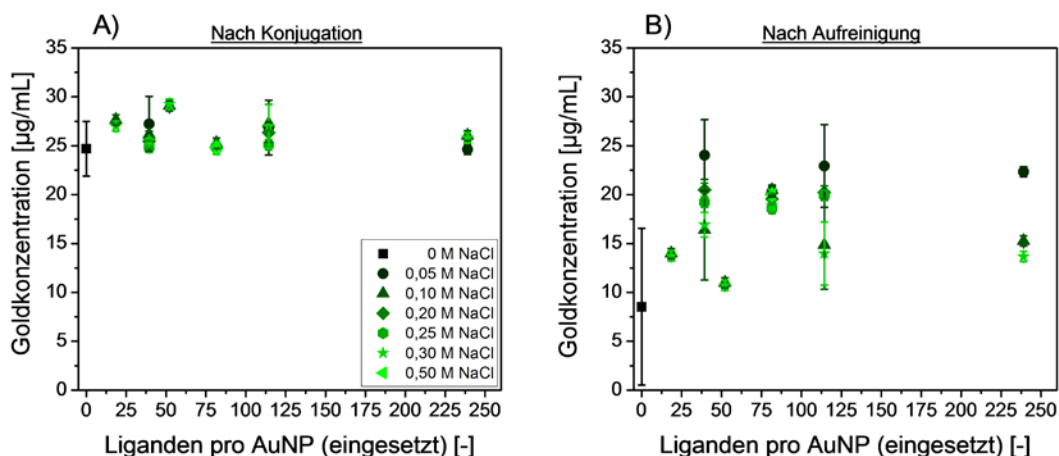


Abbildung 151: Darstellung der Goldkonzentration für Konjugate aus 5'DNA_{CT30T10} in Abhängigkeit der eingesetzten Menge an Liganden pro AuNP vor (A) und nach (B) der Aufreinigung mittels Ultrazentrifugation für NaCl-Konzentrationen zwischen 0,01 und 0,5 mol/L.

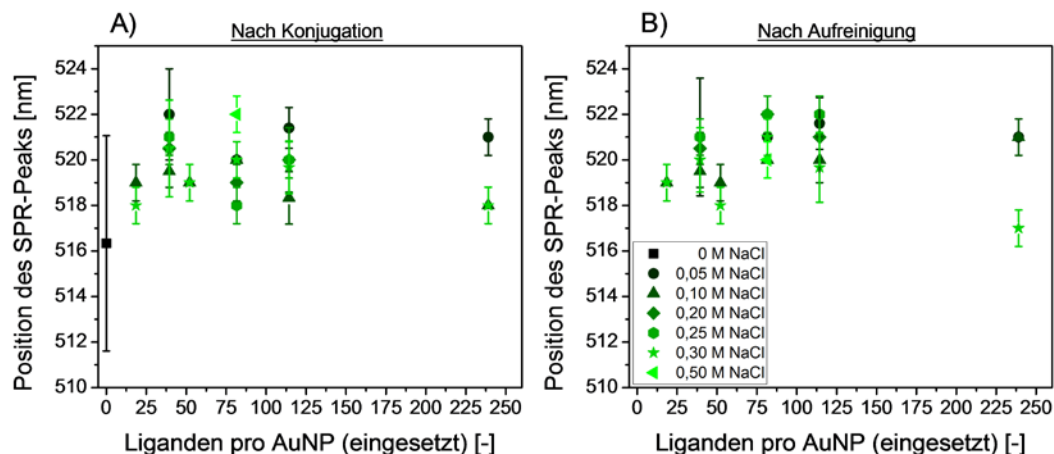


Abbildung 152: Darstellung der Position des SPR-Peaks für Konjugate aus 5'DNA_{CT30T10} in Abhängigkeit der eingesetzten Menge an Liganden pro AuNP vor (A) und nach (B) der Aufreinigung mittels Ultrazentrifugation für NaCl-Konzentrationen zwischen 0,01 und 0,5 mol/L.

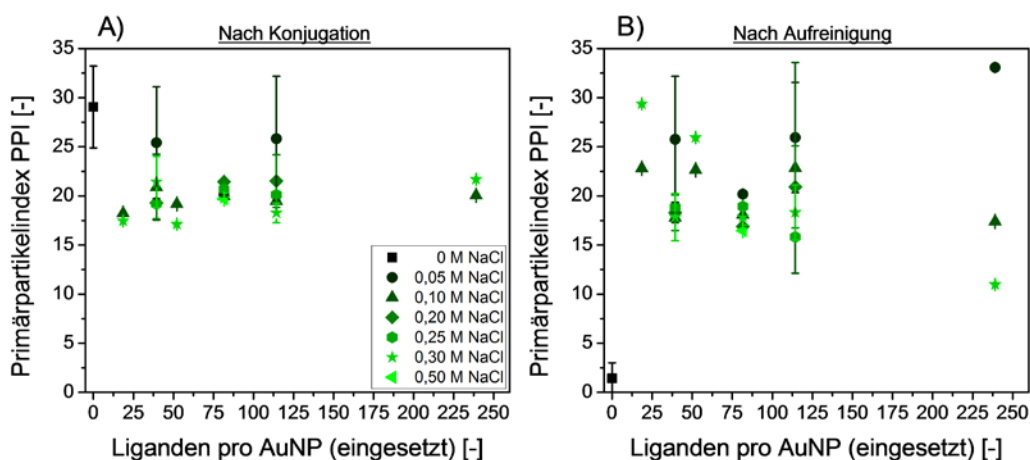


Abbildung 153: Darstellung des Primärpartikelindex für Konjugate aus 5'DNA_{CT30T10} in Abhängigkeit der eingesetzten Menge an Liganden pro AuNP vor (A) und nach (B) der Aufreinigung mittels Ultrazentrifugation für NaCl-Konzentrationen zwischen 0,01 und 0,5 mol/L.

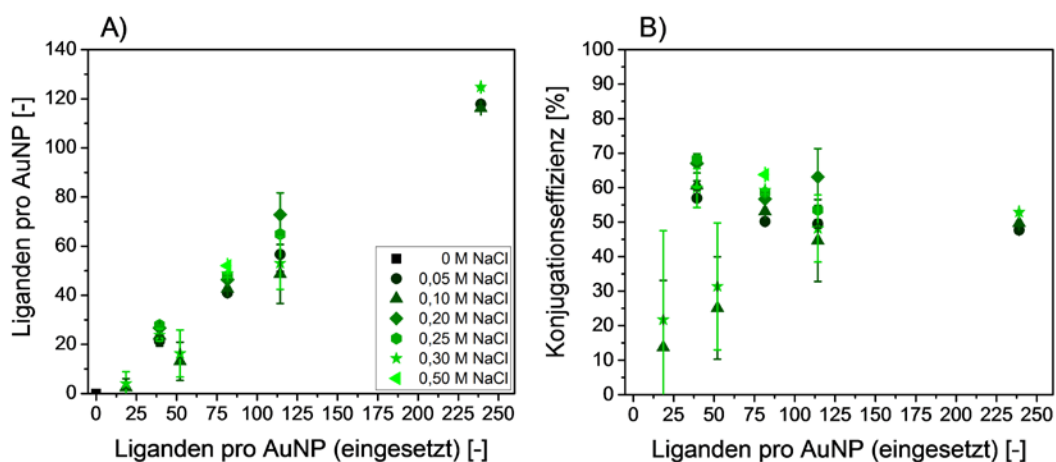


Abbildung 154: Oberflächenbedeckung der AuNP-Oligonukleotid-Konjugate. Darstellung der Anzahl gebundener Liganden pro Goldnanopartikel (A) und der Konjugationseffizienz (B) für Konjugate aus 5'DNA_{CT30T10} in Abhängigkeit der eingesetzten Menge an Liganden pro AuNP nach der Aufreinigung mittels Ultrazentrifugation für NaCl-Konzentrationen zwischen 0,01 und 0,5 mol/L.

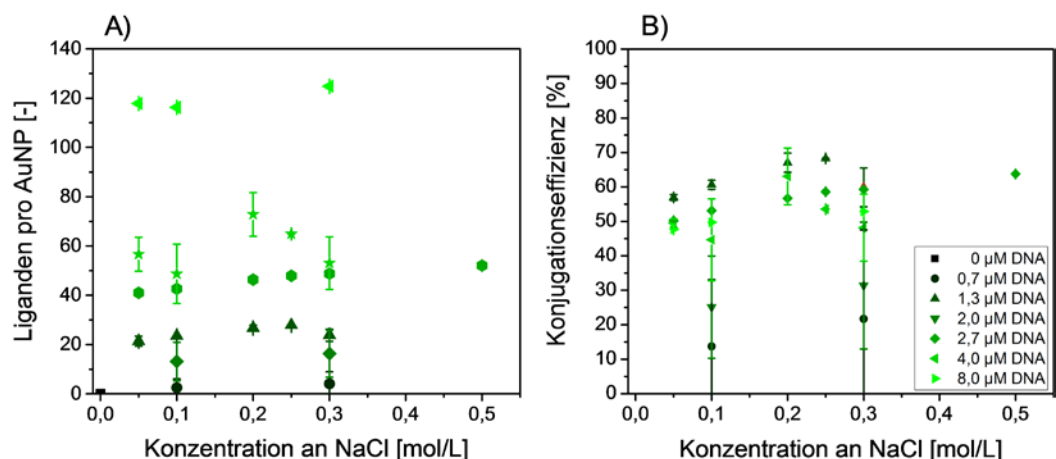


Abbildung 155: Oberflächenbedeckung der AuNP-Oligonukleotid-Konjugate. Darstellung der Anzahl gebundener Liganden pro Goldnanopartikel (A) und der Konjugationseffizienz (B) für Konjugate aus 5'DNA_{CT30T10} in Abhängigkeit der NaCl-Konzentration für verschiedene eingesetzte Ligandendosen zwischen 0 und 8 µM.

Tabelle 22: Vergleich des ermittelten Footprints in Abhängigkeit der Anzahl an Basen.

Oligonukleotid	Konzentration Oligonukleotid	Beladung	Footprint K
5'DNA _{CT26T10}	1,3 µM	27,0±6,2	2,9±0,002 nm ²
5'DNA _{CT28T10}	1,3 µM	24,9±0,003	3,2±0,7 nm ²
5'DNA _{CT30T10}	1,3 µM	27,9±0,02	2,8±0,0003 nm ²
5'LNA10	0,67 µM	9,6±0,8	8,2±0,7 nm ²
5'LNA30 _{T10}	0,67 µM	8,8±3,4	8,9±3,4 nm ²
5'LNA36 _{T10}	0,67 µM	11,8±5,6	6,6±3,1 nm ²

Vergleich verschiedener Sequenzen

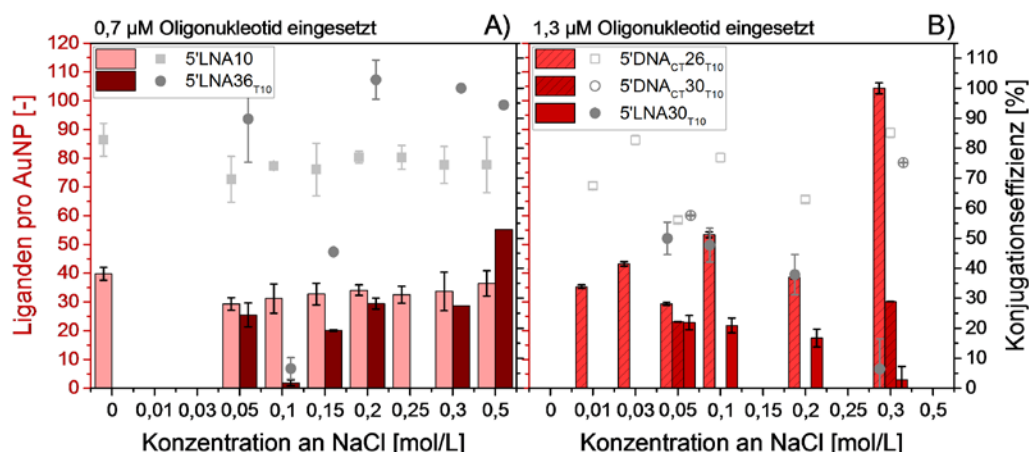


Abbildung 156: Vergleich von LNA und DNA-Liganden bei der Funktionalisierung von Goldnanopartikeln. Darstellung der Anzahl gebundener Liganden pro Goldnanopartikel (linke Achse, Balken) und der Konjugationseffizienz (rechte Achse, Vierecke und Punkte) für LNA-Oligonukleotide (A) und DNA-Oligonukleotide (B) unterschiedlicher Länge in Abhängigkeit der eingesetzten Menge an NaCl. Die LNA-Sequenzen wurden in einer Konzentration von 0,7 µM eingesetzt und die DNA-Sequenzen mit 1,3 µM.

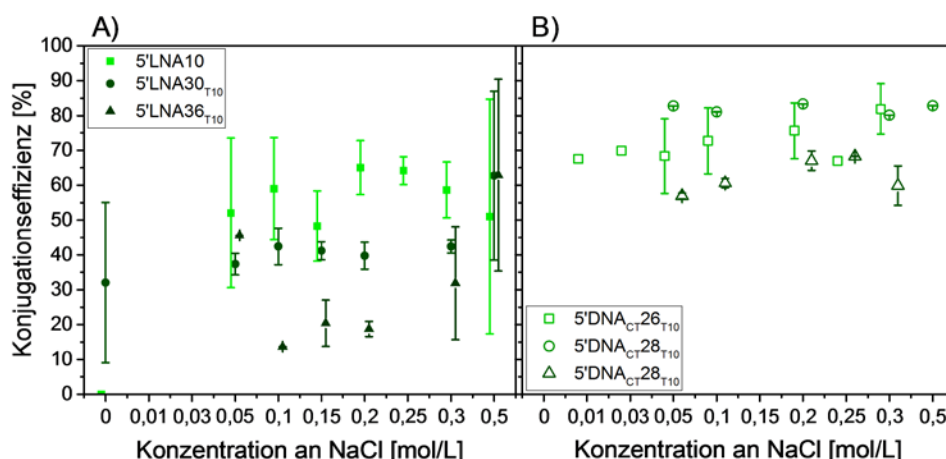


Abbildung 157: Vergleich von LNA und DNA-Liganden bei der Funktionalisierung von Goldnanopartikeln. Darstellung der Konjugationseffizienz für LNA-Oligonukleotide (A) und DNA-Oligonukleotide (B) unterschiedlicher Länge in Abhängigkeit der eingesetzten Menge an NaCl.

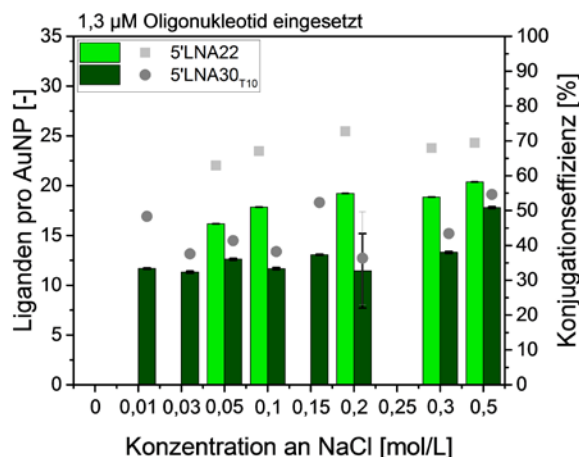


Abbildung 158: Darstellung der Oberflächenbelegung (links, Balken) und der Konjugationseffizienz (rechts, Punkte) von LNA-Konjugaten mit einer Sequenzlänge von 22 und 30 Basen in Abhängigkeit der eingesetzten Menge an NaCl.

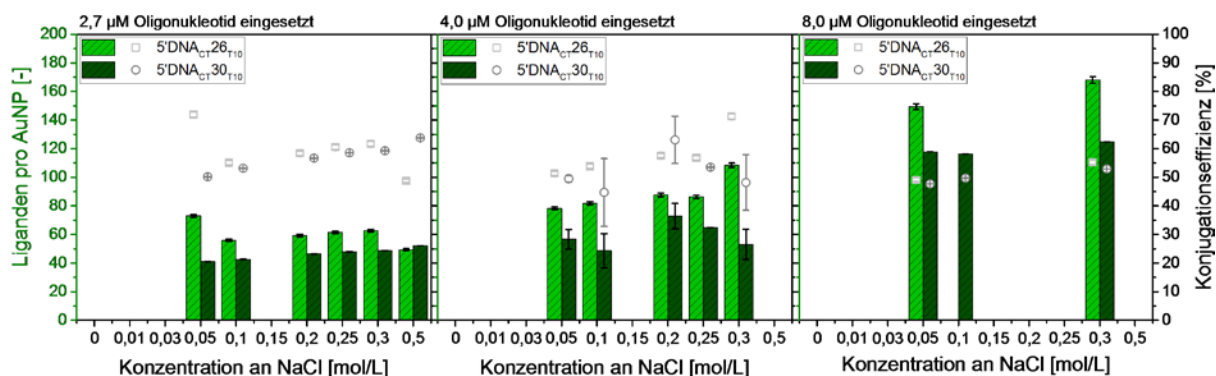


Abbildung 159: Darstellung der Oberflächenbelegung (links, Balken) und der Konjugationseffizienz (rechts, Punkte) von DNA-Konjugaten mit einer Sequenzlänge von 26 und 30 Basen in Abhängigkeit der eingesetzten Menge an NaCl für eine eingesetzte Ligandendosis von 2,7 μM (A), 4,0 μM (B) und 8,0 μM (C).

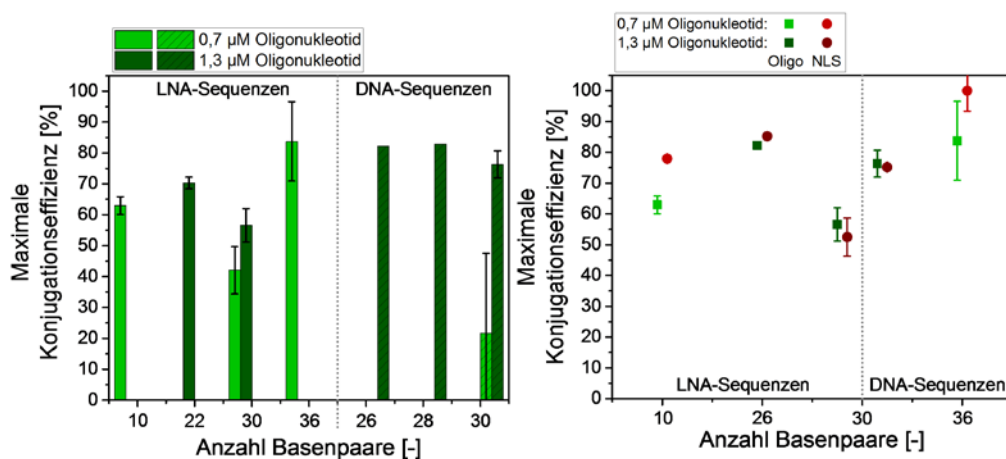


Abbildung 160: Darstellung der maximalen Konjugationseffizienz in Abhängigkeit der Anzahl an Basen für LNA- und DNA-Sequenzen mit einer eingesetzten Ligandendosis von 0,7 μM und 1,3 μM von monofunktionalen Konjugaten. (A) Darstellung der maximalen Konjugationseffizienz in Abhängigkeit der Anzahl an Basen für LNA- und DNA-Sequenzen mit einer eingesetzten Ligandendosis von 0,7 μM und 1,3 μM von bifunktionalen Konjugaten mit 2 μM NLS_{Cys}. (B)

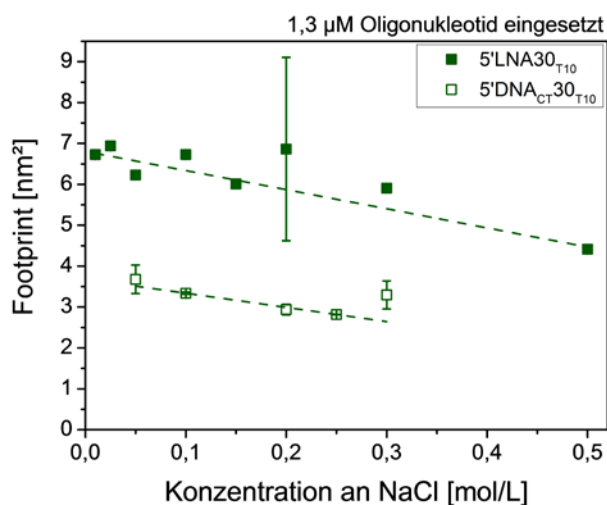


Abbildung 161: Darstellung des Platzbedarfs von DNA- und LNA-Liganden auf Goldnanopartikeln anhand des Footprints von 5'LNA30_{T10} und 5'DNA_{CT}30_{T10}.

Separate Darstellung einzelner Sequenzen

5'DNA_{CT26T10}

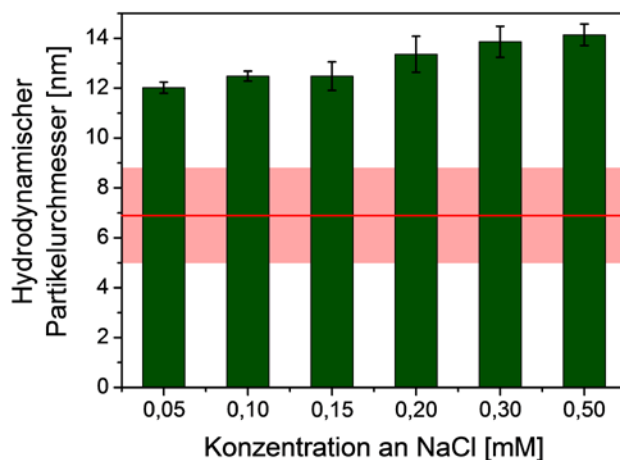


Abbildung 162: Darstellung des hydrodynamischen Partikeldurchmessers (Volumenverteilung) von AuNP-5'DNA_{CT26T10}-Konjugaten in Abhängigkeit der NaCl-Konzentration.

Tabelle 23: Parameter der verschiedenen Adsorptionsisothermen nach Anpassung der Messdaten aus der Ermittlung der Oberflächenbeladung an AuNP-5'DNA_{CT26T10}-Konjugaten für verschiedene NaCl-Konzentrationen.

Isotherme	Parameter	0,050 M NaCl	0,100 M NaCl	0,200 M NaCl	0,250 M NaCl	0,300 M NaCl
Langmuir	q _{max}	82,61	55,22	67,78	1,00	752,17
	K	$1,60 \cdot 10^{44}$	$-2,5 \cdot 10^{46}$	$1,65 \cdot 10^{45}$	1,00	0,04
	R ²	-0,50	-1,83	-1,00	-1,00	0,95
Freundlich	n	1,18	1,11	1,09	1,00	1,16
	K	25,73	23,51	24,64	1,00	29,01
	R ²	0,93	0,99	0,99	0,99	0,94
Temkin	K	-781,04	-600,85	-640,65	1,00	-777,43
	R ²	-11,06	-23,95	-24,43	-24,43	-5,96
Exp. Anpassung	y ₀	228,37	143,71	167,23	113,45	228,72
	A	-242,64	-168,65	-190,17	-175,94	-258,23
	R ₀	-0,14	-0,25	-0,22	-0,47	-0,18
	R ²	0,88	0,00	0,00	0,00	0,99

5'DNA_{CT28T10}

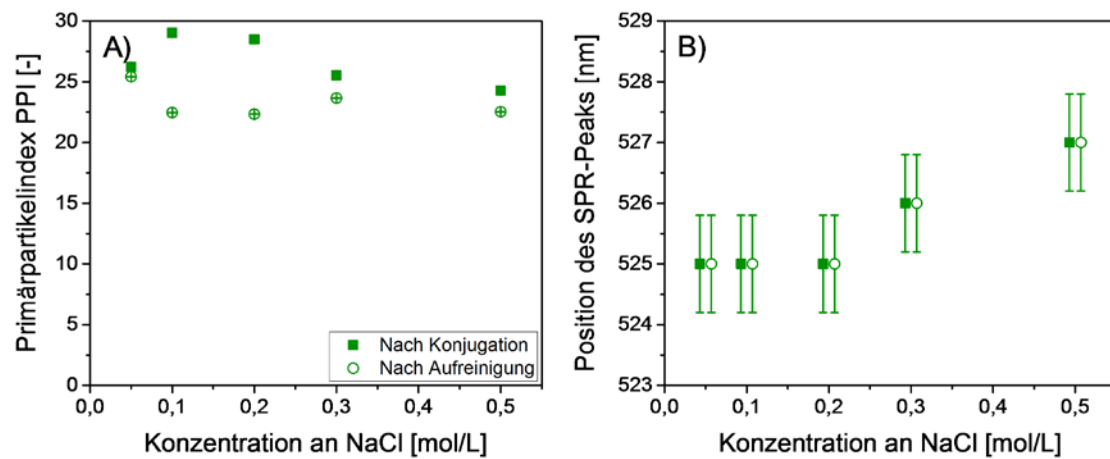


Abbildung 163: Darstellung des Primärpartikelindex PPI (A) und der Position des SPR-Peaks (B) in Abhängigkeit der NaCl-Konzentration nach der Konjugation und nach der Aufreinigung.

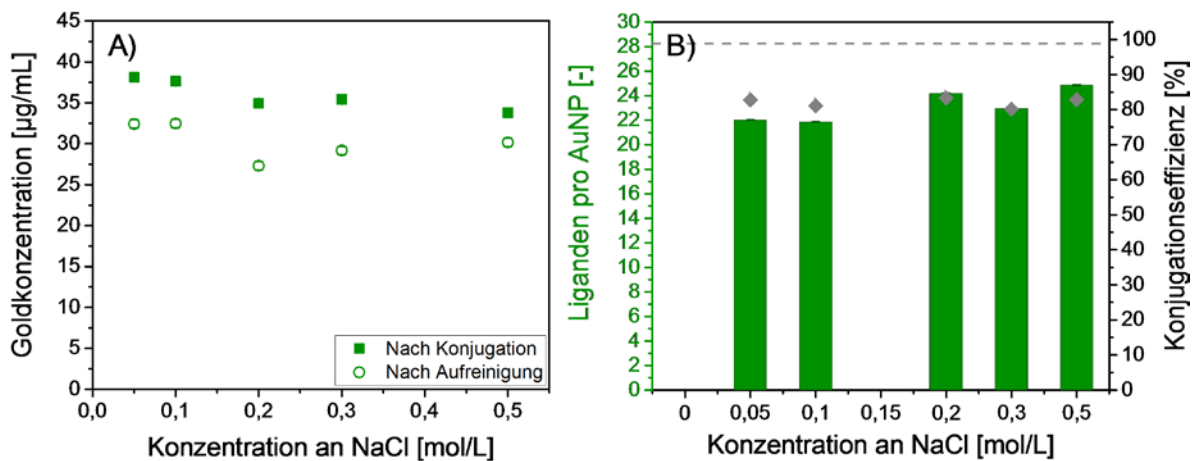


Abbildung 164: Darstellung der Goldkonzentration (A) und der Oberflächenbelegung (B, linke Achse, Balken) sowie Konjugationseffizienz (B, rechte Achse, Rauten) in Abhängigkeit der NaCl-Konzentration nach der Konjugation und nach der Aufreinigung.

5'LNA22

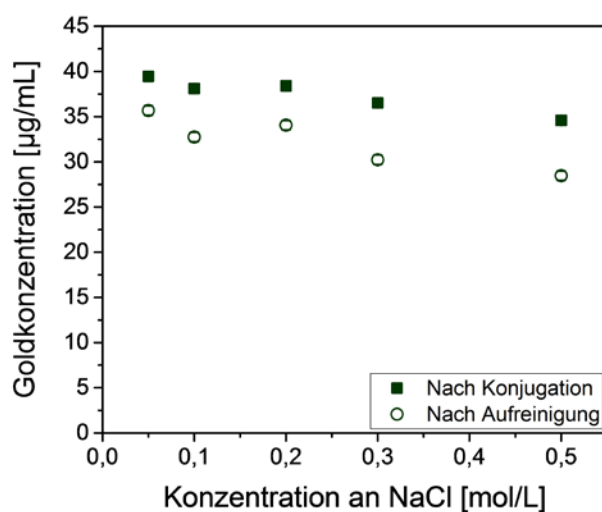


Abbildung 165: Darstellung der Goldkonzentration in Abhängigkeit der NaCl-Konzentration nach der Konjugation und nach der Aufreinigung.

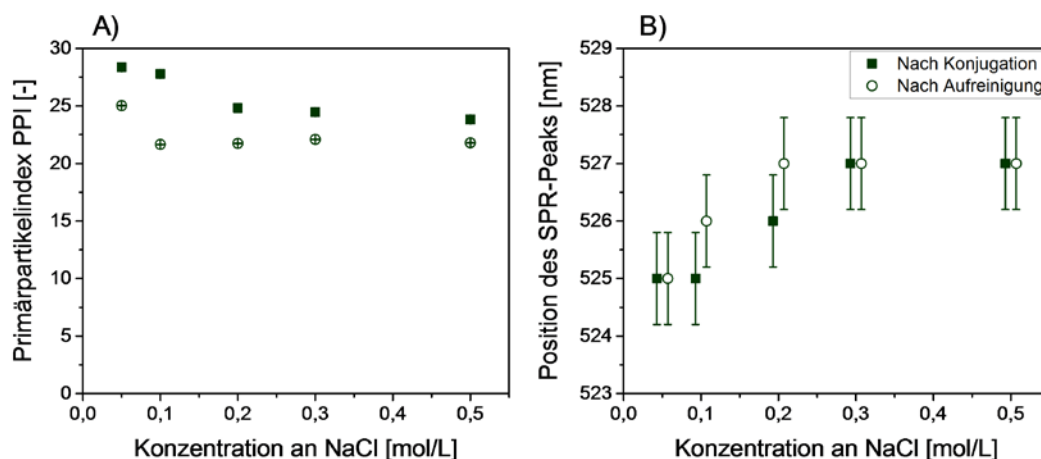


Abbildung 166: Darstellung des Primärpartikelindex PPI (A) und der Position des SPR-Peaks (B) in Abhängigkeit der NaCl-Konzentration nach der Konjugation und nach der Aufreinigung.

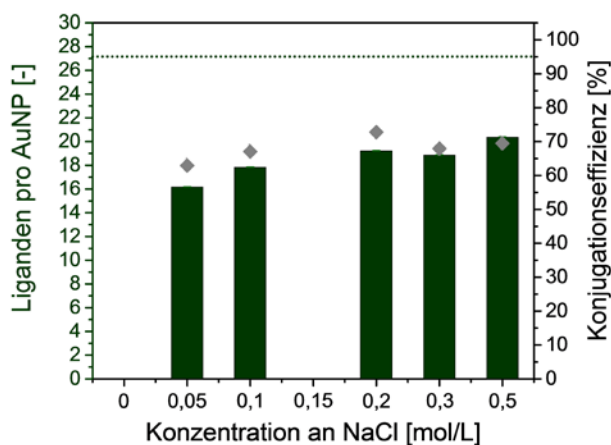


Abbildung 167: Darstellung der Oberflächenbelegung (linke Achse, Balken) sowie der Konjugationseffizienz (rechte Achse, Rauten) in Abhängigkeit der NaCl-Konzentration nach der Konjugation und nach der Aufreinigung.

5'LNA30_{T10}

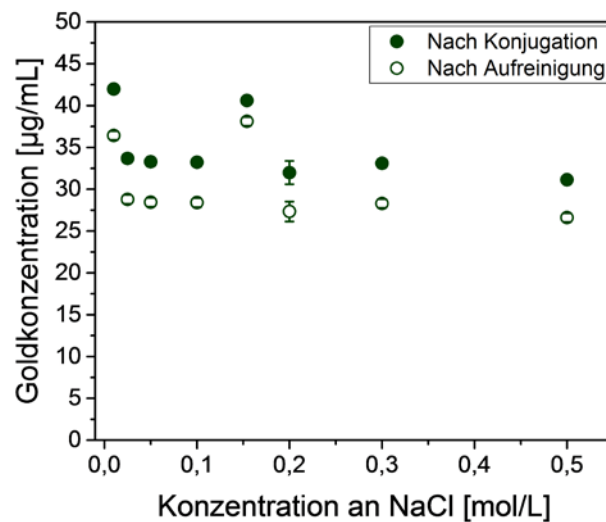


Abbildung 168: Darstellung der Goldkonzentration in Abhängigkeit der NaCl-Konzentration nach der Konjugation und nach der Aufreinigung.

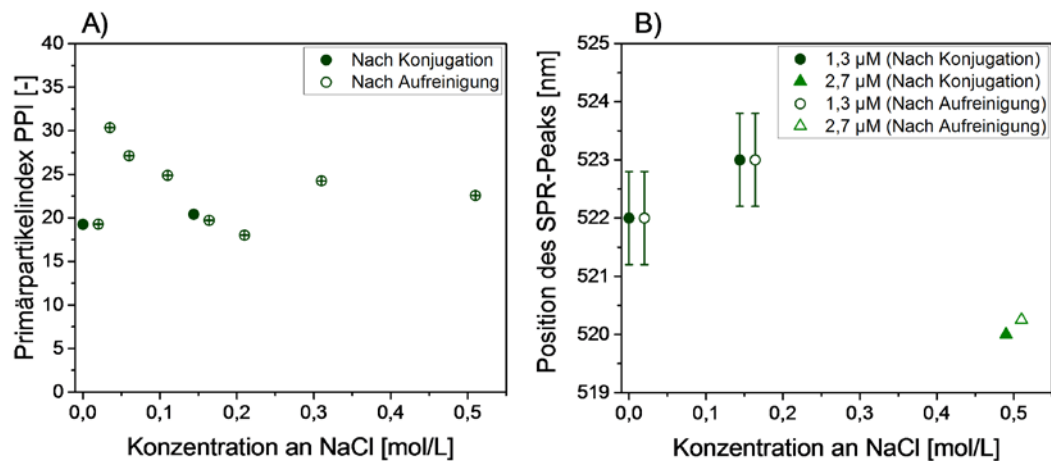


Abbildung 169: Darstellung des Primärpartikelindex PPI (A) und der Position des SPR-Peaks (B) in Abhängigkeit der NaCl-Konzentration nach der Konjugation mit 1,3 µM und 2,7 µM 5'LNA30_{T10} und nach der Aufreinigung.

7.8.7. Einfluss von Peptiden auf Goldnanopartikel-Oligonukleotid-Konjugaten

5'DNA_{CT26T10}

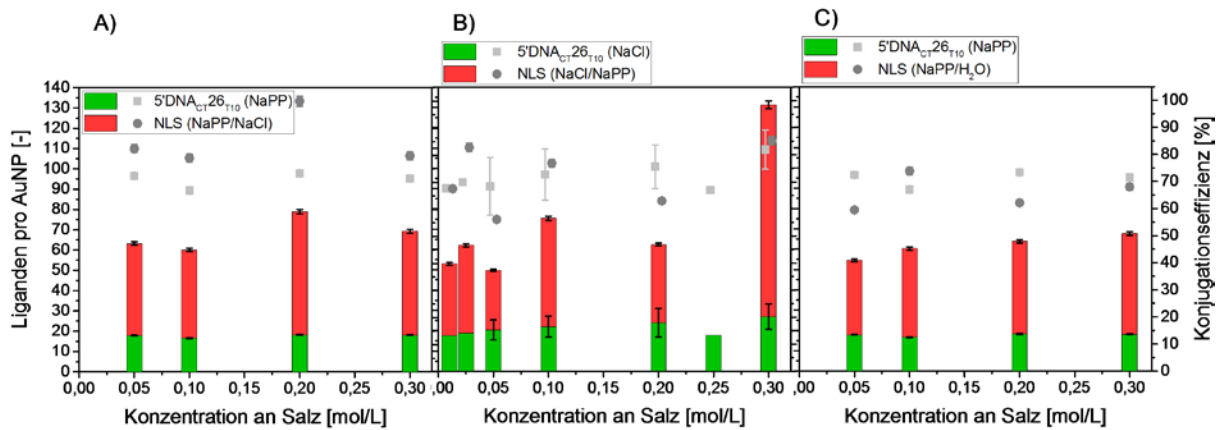


Abbildung 170: Darstellung der Ligandenbelegung (linke Achse, Balken) und Konjugationseffizienz (rechte Achse, Vierecke und Punkte) an Oligonukleotid und NLS_{Cys}-Peptid in Abhängigkeit der Salzkonzentration für AuNP-5'DNA_{CT26T10}-Konjugate für verschiedene Salze beim Redispersieren der Konjugate.

5'LNA10

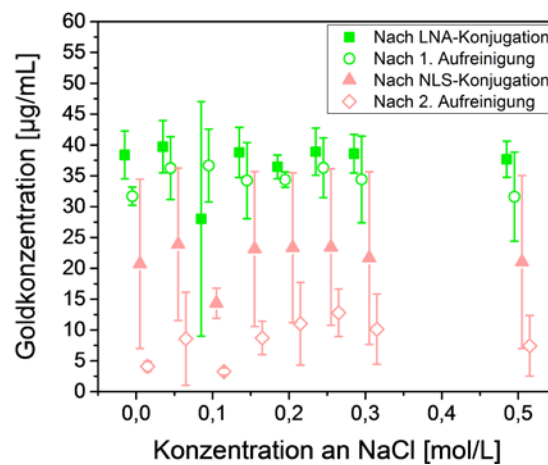


Abbildung 171: Vergleich von monofunktionalen und bifunktionalen Konjugaten mittels Goldkonzentration in Abhängigkeit der bei der Oligonukleotid-Konjugation verwendeten NaCl-Konzentration.

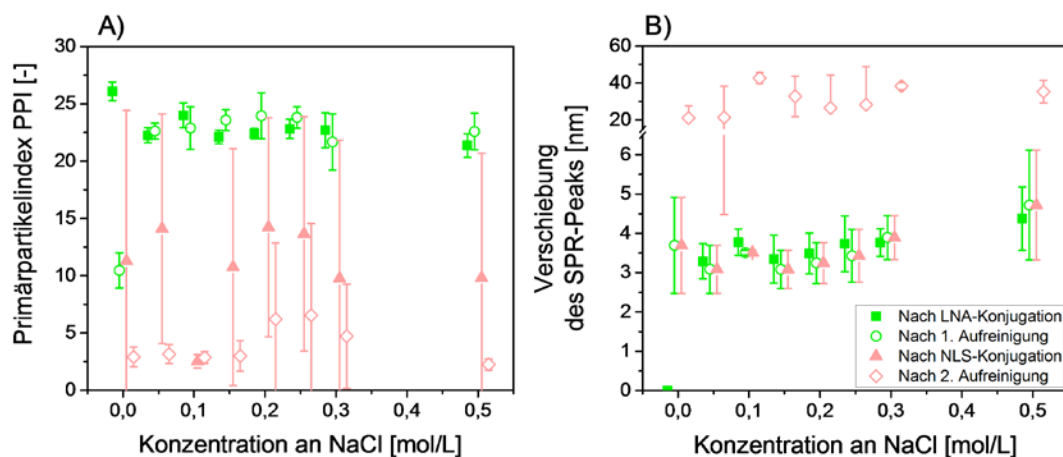


Abbildung 172: Vergleich von monofunktionalen und bifunktionalen Konjugaten mittels Primärpartikelindex PPI (A) und Verschiebung des SPR-Peaks (B) in Abhängigkeit der bei der Oligonukleotid-Konjugation verwendeten NaCl-Konzentration.

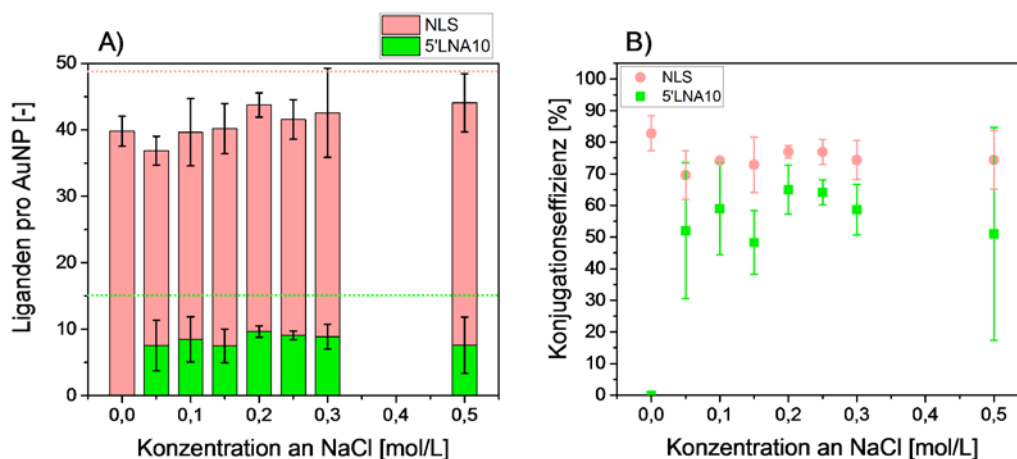


Abbildung 173: Darstellung der Ligandenbelegung (A) und Konjugationseffizienz (B) an Oligonukleotid (5'LNA10) und NLS_{Cys}-Peptid in Abhängigkeit der bei der Oligonukleotid-Konjugation verwendeten NaCl-Konzentration.

5'LNA30_{T10}

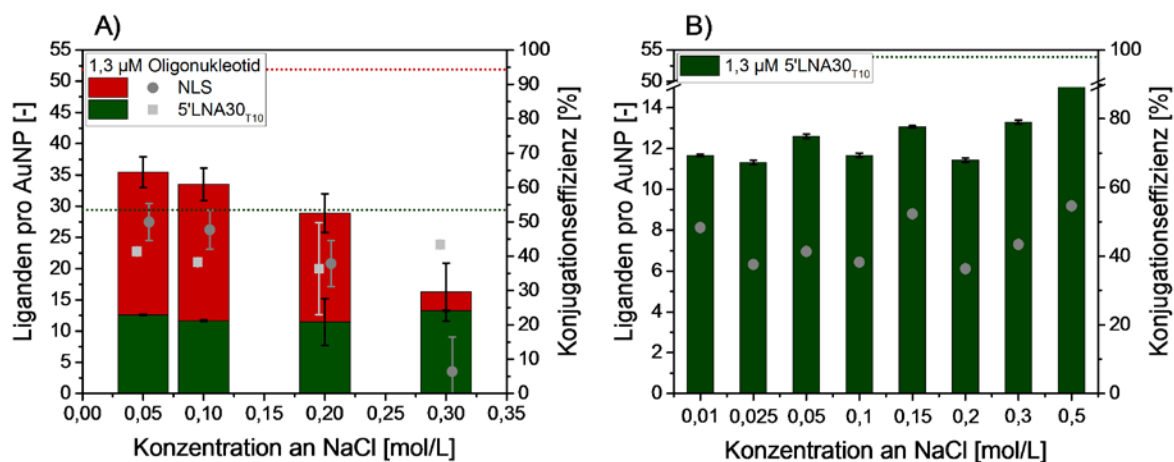


Abbildung 174: Darstellung der Ligandenbelegung (A und B, linke Achse, Balken) und Konjugationseffizienz (A und B, rechte Achse, Vierecke und Punkte) an Oligonukleotid und NLS_{Cys}-Peptid in Abhängigkeit der Salzkonzentration für AuNP-5'LNA30_{T10}-Konjugate für monofunktionale (B) und bifunktionale (A) Konjugate.

5'LNA36_{T10}

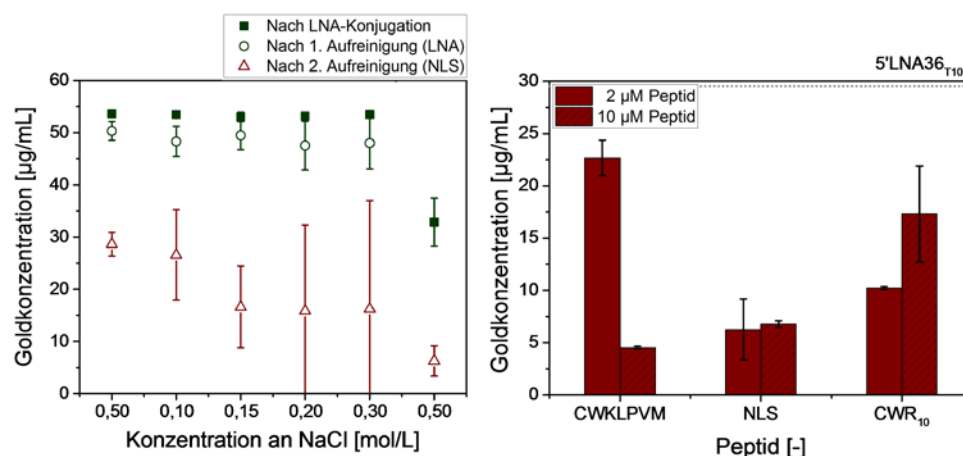


Abbildung 175: Vergleich von monofunktionalen und bifunktionalen Konjugaten mittels Goldkonzentration in Abhängigkeit der bei der Oligonukleotid-Konjugation verwendeten NaCl-Konzentration. (A) Vergleich verschiedener Peptide. Goldkonzentration der Konjugate mit den Peptiden NLS_{Cys}, CWR10 und CWKLPVM bei verschiedenen Initial-Konzentrationen bei der Anbindung auf AuNP-5'LNA36_{T10}-Konjugaten. Die gestrichelte Kennlinie markiert die Werte der AuNP-LNA-Konjugate ohne Peptid. (B)

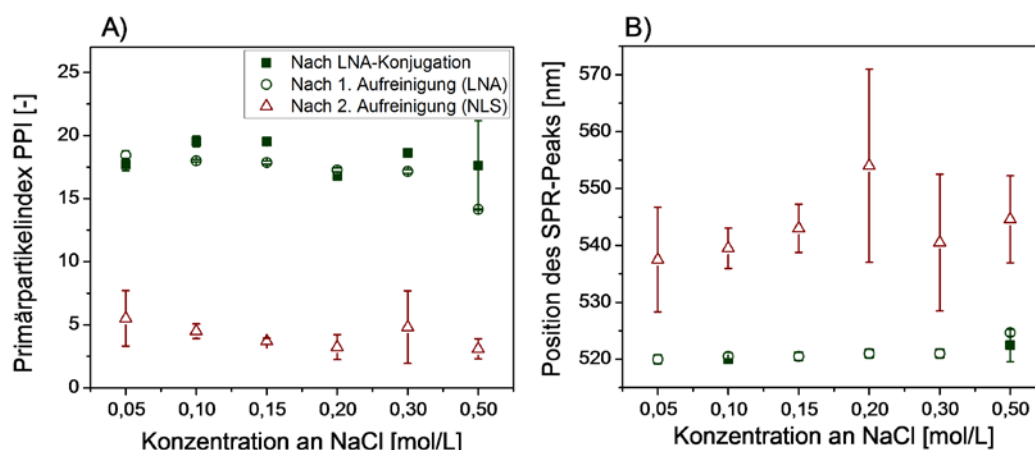


Abbildung 176: Vergleich von monofunktionalen und bifunktionalen Konjugaten mittels Primärpartikelindex (A) und Position des SPR-Peaks (B) in Abhängigkeit der bei der Oligonukleotid-Konjugation verwendeten NaCl-Konzentration.

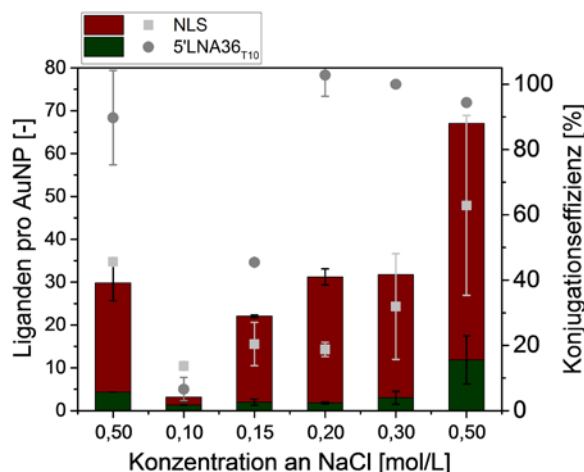


Abbildung 177: Darstellung der Ligandenbelegung (linke Achse, Balken) und Konjugationseffizienz (rechte Achse, Vierecke und Punkte) an Oligonukleotid (5'LNA36_{T10}) und NLS_{Cys}-Peptid in Abhängigkeit der bei der Oligonukleotid-Konjugation verwendeten NaCl-Konzentration.

7.8.8. Einfluss von Biomolekülen auf mit Salz behandelte Goldnanopartikel-Konjugate

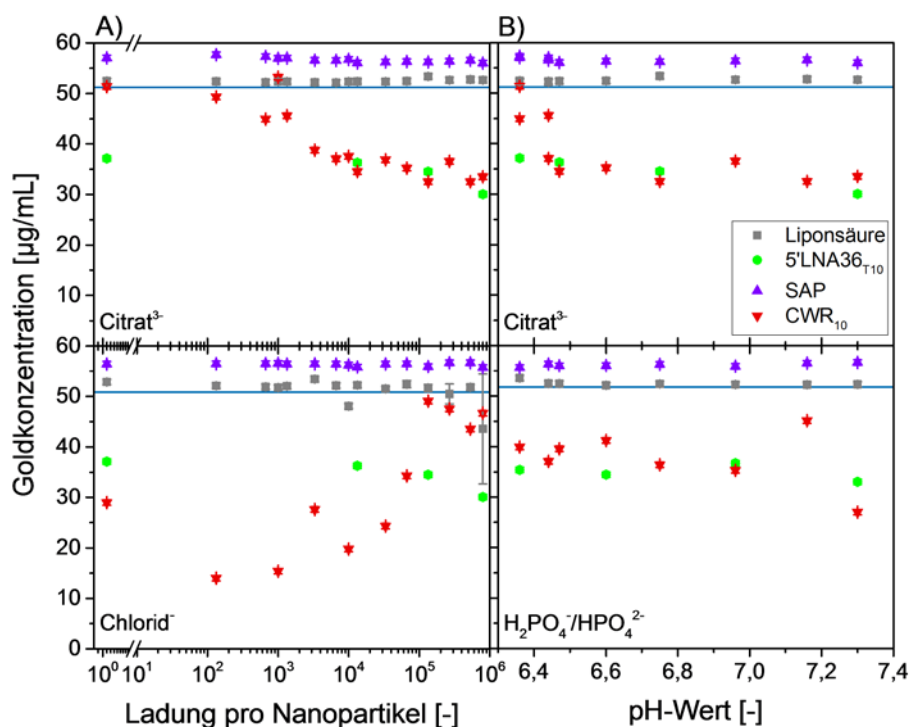


Abbildung 178: Stabilität von bifunktionalen Konjugaten. Darstellung der Goldkonzentration von bifunktionalen Konjugaten für die Biomoleküle Liponsäure, 5'LNA36_{T10}, SAP und CWR₁₀ auf der Basis von Citrat-, Chlorid- und Phosphat-konjugierter Goldnanopartikel in Abhängigkeit der Ladung pro Nanopartikel (A) und des pH-Wertes. (B) Die blauen Kennlinien stellen die Werte der ligandenfreien Nanopartikel (ohne Salz und Liganden) dar.

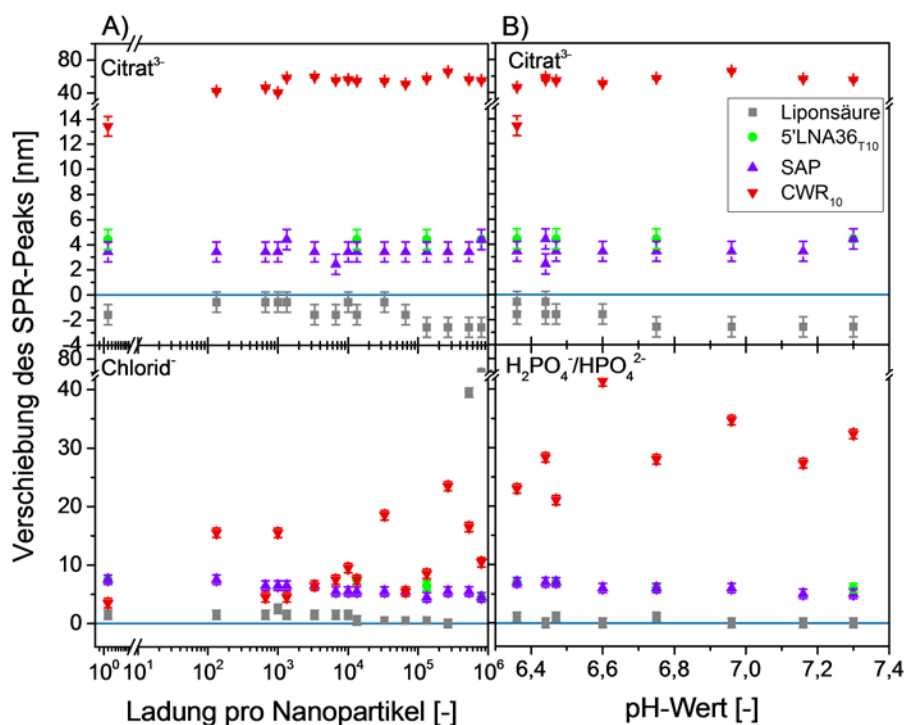


Abbildung 179: Stabilität von bifunktionalen Konjugaten. Darstellung der Verschiebung des SPR-Peaks von bifunktionalen Konjugaten für die Biomoleküle Liponsäure, 5'LNA36_{T10}, SAP und CWR₁₀ auf der Basis von Citrat-, Chlorid- und Phosphat-konjugierter Goldnanopartikel in Abhängigkeit der Ladung pro Nanopartikel (A) und des pH-Wertes. (B) Die blauen Kennlinien stellen die Werte der ligandenfreien Nanopartikel (ohne Salz und Liganden) dar.

Anhang: Ergänzende Graphiken zum Kapitel Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 24: Stabilität von bifunktionalen Konjugaten. Zetapotentialwerte von Goldnanopartikeln, welche mit Natriumchlorid behandelt wurden und mit Liponsäure, 5'LNA36T₁₀, SAP und CWR₁₀ bifunktionalisiert wurden.

[NaCl] mM	Ionenstärke [mM]	Zetapotential [mV]				
		Cl ⁻	Cl ⁻ + Liponsäure	Cl ⁻ + 5'LNA36T ₁₀	Cl ⁻ + SAP	Cl ⁻ + CWR ₁₀
0	0	-31,8±2,7	-31,0±3,3	-20,2±2,4	13,2±0,4	18,4±0,3
0,045	0,045	-21,8±5,8	-39,5±4,1	/	12,0±0,4	21,2±1,2
0,090	0,090	-30,9±2,1	-25,8±4,2	-20,8±1,6	12,3±0,4	20,6±1,2
0,450	0,450	-31,5±2,0	-27,0±5,8	/	11,7±1,2	22,1±0,1
0,900	0,900	-36,2±4,3	-42,0±1,1	/	11,7±0,2	21,5±1,4
4,5	4,5	-39,4±4,7	-40,7±2,9	/	13,0±1,0	28,9±0,3
9	9	-20,7±5,0	-39,4±1,3	-16,3±4,4	13,2±0,4	33,0±0,4
18	18	-41,4±1,7	-42,3±3,1	/	12,9±0,7	32,1±0,4
36	36	-47,7±1,5	-34,5±4,1	/	12,4±0,7	37,3±0,7
54	54	-45,9±2,3	-46,9±6,8	-16,1±3,8	13,0±0,3	38,8±3,3

Tabelle 25: Stabilität von bifunktionalen Konjugaten. Zetapotentialwerte von Goldnanopartikeln, welche mit Trinatriumcitrat behandelt wurden und mit Liponsäure, 5'LNA36T₁₀, SAP und CWR₁₀ bifunktionalisiert wurden.

[Na ₃ - Citrat] mM	Ionen- stärke [mM]	pH	Zetapotential [mV]				
			Citrat ³⁻	Citrat ³⁻ + Lipon- säure	Citrat ³⁻ + 5'LNA36T ₁₀	Citrat ³⁻ + SAP	Citrat ³⁻ + CWR ₁₀
0	0	6,36	-37,6±2,3	-41,6±2,6	-20,2±2,4	-38,4±1,4	26,0±1,2
0,015	0,09	6,36	-28,4±3,5	-24,2±3,0	/	-36,7±2,0	15,4±0,5
0,030	0,18	6,44	-39,4±4,4	-19,1±2,1	-11,3±1,2	-30,7±2,2	25,4±1,3
0,150	0,9	6,44	-29,6±3,5	-39,6±0,9	/	-32,6±4,4	8,5±0,2
0,3	1,8	6,47	-41,5±4,7	-42,9±4,6	/	-31,3±2,1	9,9±0,5
1,5	9	6,6	-39,7±2,6	-24,1±1,0	/	-23,7±2,1	0,2±0,3
3	18	6,75	-30,9±4,8	-36,9±3,0	-17,7±1,5	-34,2±2,8	0,8±0,2
6	36	6,96	-42,6±1,3	-40,5±0,9	/	-28,1±0,6	- 15,8±2,7
12	72	7,16	-43,6±3,8	-40,6±2,5	/	-21,3±3,8	-1,6±0,4
18	108	7,3	-38,4±2,9	-43,4±3,8	-19,9±1,5	-26,5±0,6	-9,7±2,0

Tabelle 26: Stabilität von bifunktionalen Konjugaten. Zetapotentialwerte von Goldnanopartikeln, welche mit Natriumphosphat-Puffer behandelt wurden und mit Liponsäure, 5'LNA36_{T10}, SAP und CWR₁₀ bifunktionalisiert wurden.

pH	Zetapotential [mV]				
	H ₂ PO ₄ ⁻ /HPO ₄ ²⁻	H ₂ PO ₄ ⁻ /HPO ₄ ²⁻ + Liponsäure	H ₂ PO ₄ ⁻ /HPO ₄ ²⁻ + 5'LNA36 _{T10}	H ₂ PO ₄ ⁻ /HPO ₄ ²⁻ + SAP	H ₂ PO ₄ ⁻ /HPO ₄ ²⁻ + CWR ₁₀
6,36	-31,0±1,1	-33,4±2,9	-18,0±1,2	-29,9±0,9	16,4±0,4
6,36	/	-33,4±2,9	/	-29,9±0,9	16,4±0,4
6,44	-35,7±5,5	-34,2±2,8	/	-33,8±2,4	19,2±0,6
6,44	/	-34,2±2,8	/	-33,8±2,4	19,2±0,6
6,47	-39,1±7,8	-22,9±0,4	/	-32,1±1,0	20,3±2,2
6,60	-39,3±0,9	-30,8±2,7	-17,1±4,7	-36,7±2,5	23,3±0,2
6,75	-34,1±2,1	-23,3±2,1	/	-30,3±2,0	20,3±0,3
6,96	-38,0±2,8	-16,0±4,3	-18,2±1,2	-32,9±2,7	19,5±0,3
7,16	-42,6±7,5	-19,3±3,1	/	-33,4±1,2	21,2±1,3
7,30	-42,2±1,7	-17,8±0,2	-17,8±2,4	-35,2±2,3	19,9±0,2

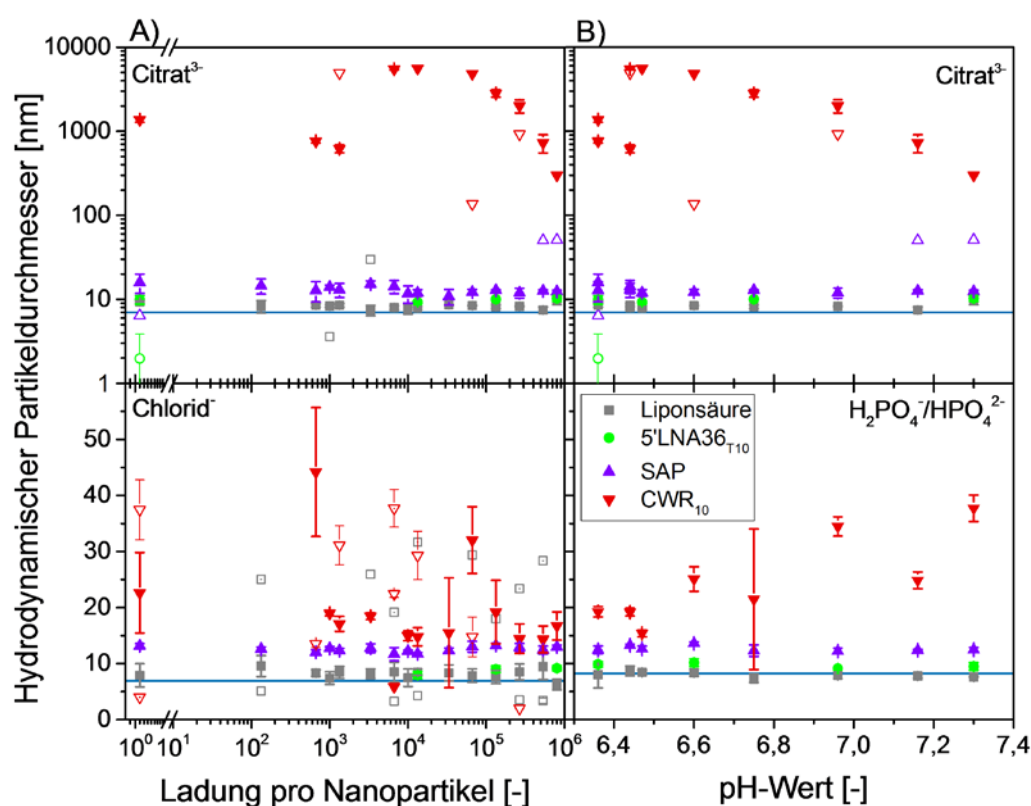


Abbildung 180: Stabilität von bifunktionalen Konjugaten. Darstellung des hydrodynamischen Partikeldurchmessers von bifunktionalen Konjugaten für die Biomoleküle Liponsäure, 5'LNA36_{T10}, SAP und CWR₁₀ auf der Basis von Citrat-, Chlorid- und Phosphat-konjugierter Goldnanopartikel in Abhängigkeit der Ladung pro Nanopartikel (A) und des pH-Wertes. (B) Die blauen Kennlinien stellen die Werte der ligandenfreien Nanopartikel (ohne Salz und Liganden) dar.

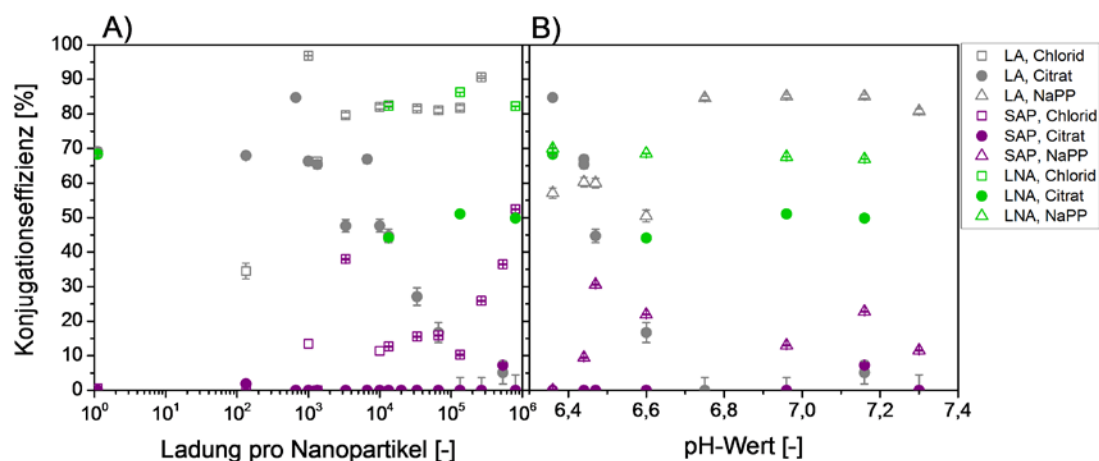


Abbildung 181: Darstellung der Konjugationseffizienz an Liponsäure, SAP und 5'LNA36T₁₀ auf Citrat- und Phosphatkonjugierten Goldnanopartikeln in Abhängigkeit der Ladung pro Nanopartikel (A) und des pH-Wertes. (B)

7.8.9. Stabilität von Goldnanopartikel-LNA-Konjugaten

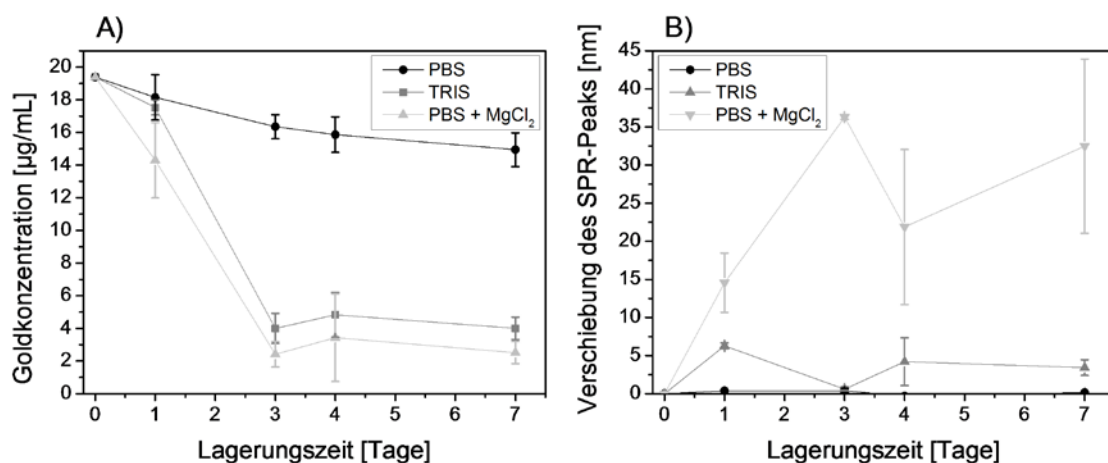


Abbildung 182: Stabilität von AuNP-5'LNA30T₁₀ in verschiedenen Puffern. Goldkonzentration (A) und Verschiebung des SPR-Peaks der Konjugate in den genannten Puffern in Abhängigkeit der Lagerungszeit. (B)

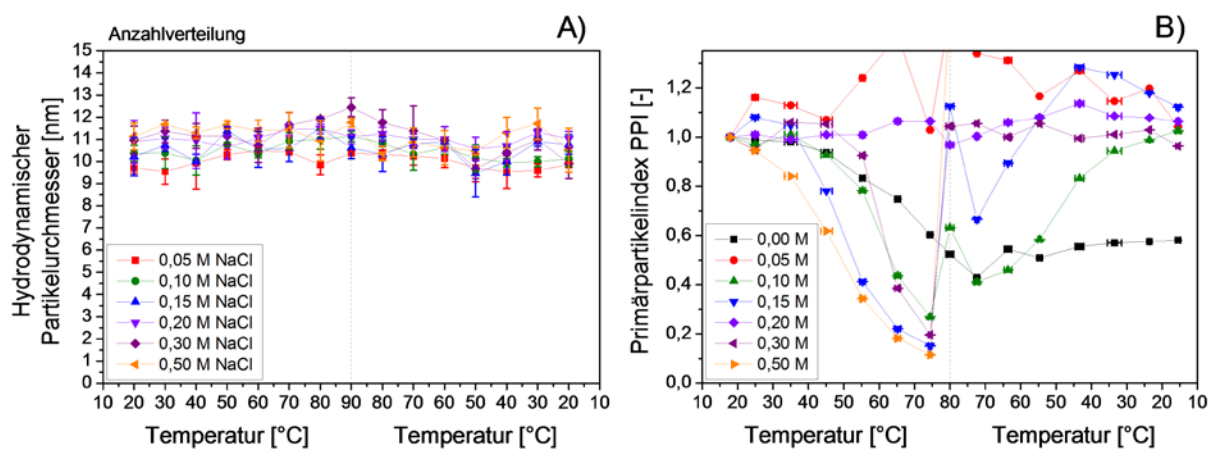


Abbildung 183: Einfluss der Temperatur auf AuNP-LNA-Konjugate. Darstellung des hydrodynamischen Partikeldurchmessers (Anzahlverteilung) (A) und des Primärpartikelindex (B) abhängig von der Temperatur. Es wurden Konjugate mit unterschiedlichen Mengen an Natriumchlorid während der Konjugation untersucht.

7.8.10. Hybridisierung von AuNP-LNA-Konjugaten an synthetische ssDNA und dsDNA-Proben

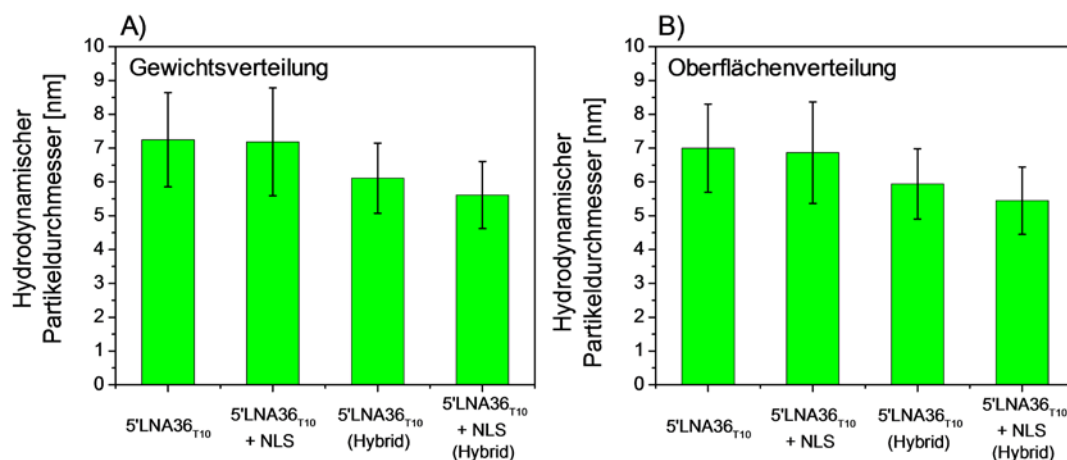


Abbildung 184: Darstellung des hydrodynamischen Partikeldurchmessers aus der Gewichtsverteilung (A) und der Oberflächenverteilung (B) von AuNP-5'LNA36_{T10}-Konjugaten mit und ohne Peptid sowie als Hybrid mit dsDNA.

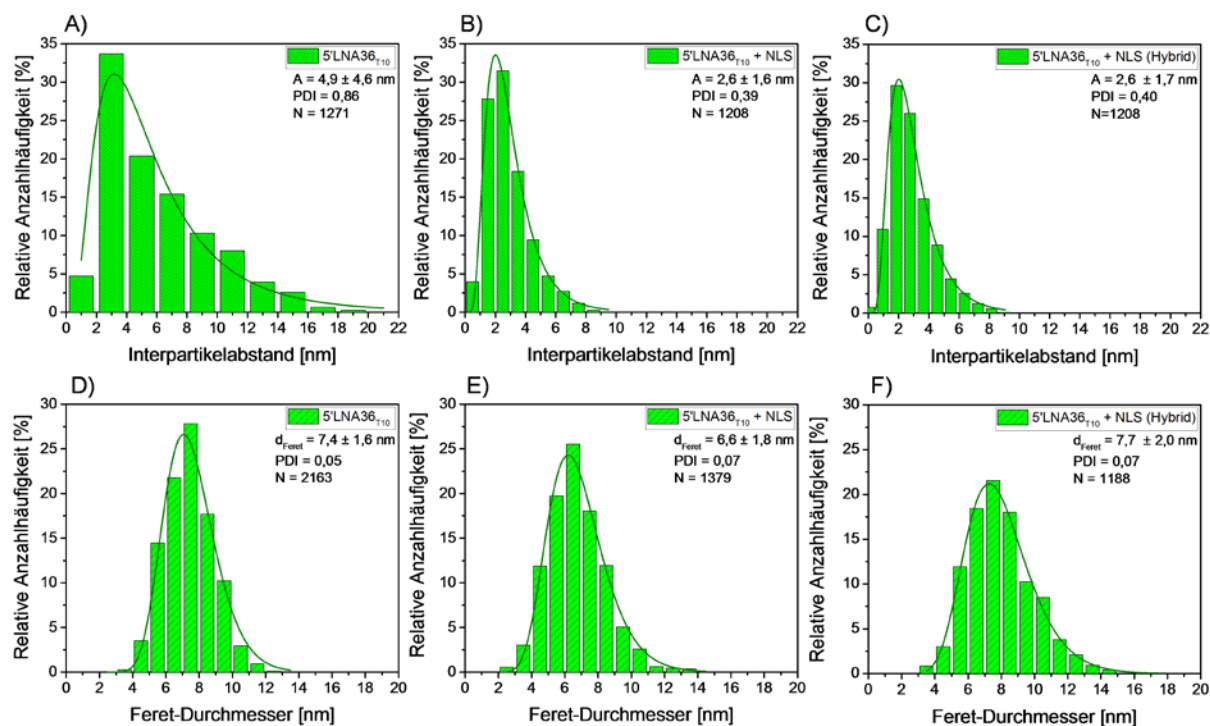


Abbildung 185: Darstellung der relativen Anzahlhäufigkeit der Interpartikelabstände (A, B, C) und der Feret-Durchmesser (D, E, F) von AuNP-5'LNA36_{T10}-Konjugaten mit und ohne Peptid sowie als Hybrid mit dsDNA.

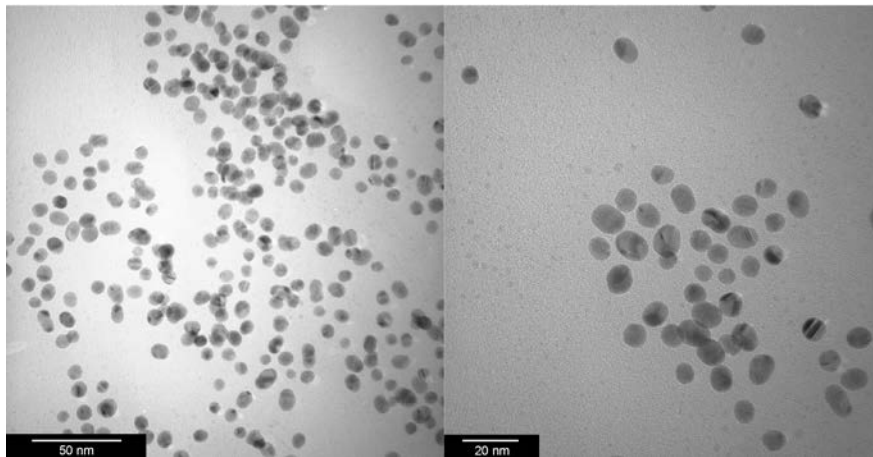


Abbildung 186: Beispielhafte TEM-Aufnahme von hybridisierten AuNP-5'LNA36T10-NLS_{cys}-Konjugaten mit entsprechender dsDNA.

7.8.11. Analyse der Wechselwirkungen von Goldnanopartikel-Konjugaten mit Rinderspermien

Analyse der Penetrationseigenschaften von Konjugaten in Rinderspermien

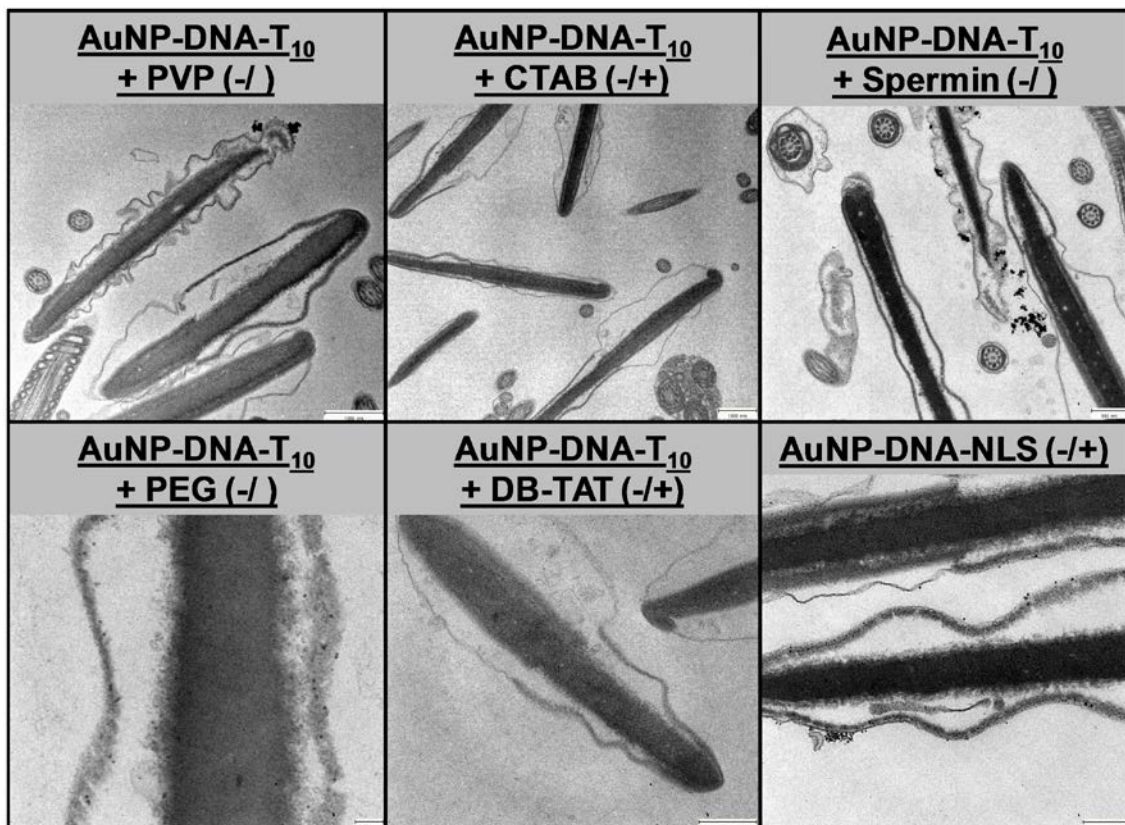


Abbildung 187: Transmissionselektronische Aufnahmen von Rinderspermien zur Ermittlung der Partikel-Membran-Wechselwirkungen. Die Spermien wurden zuvor 2 Stunden bei 37°C mit verschiedenen Konjugaten inkubiert.

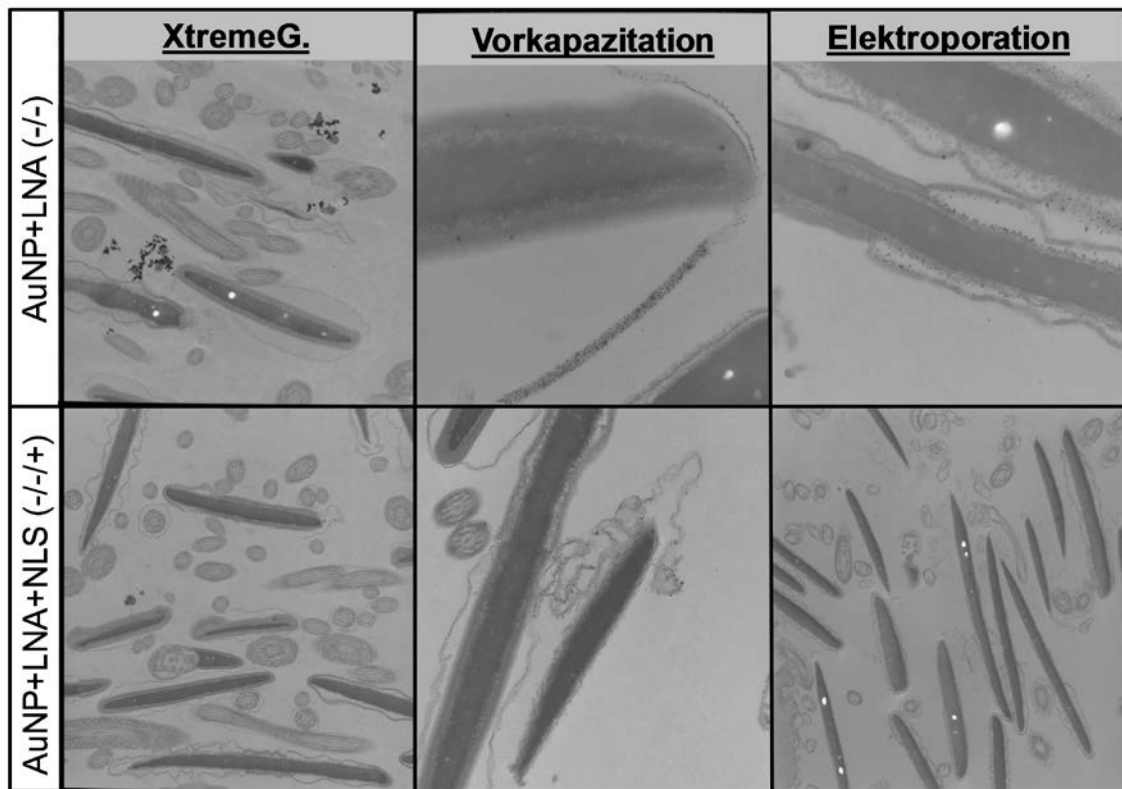


Abbildung 188: Transmissionselektronische Aufnahmen von Rinderspermien zur Ermittlung der Partikel-Membran-Wechselwirkungen. Die Spermien wurden zuvor 2 Stunden bei 37°C mit verschiedenen Konjugaten inkubiert und mit weiteren Methoden mit Transfektionsmitteln, Vorkapazitation und Elektroporation nachbehandelt.

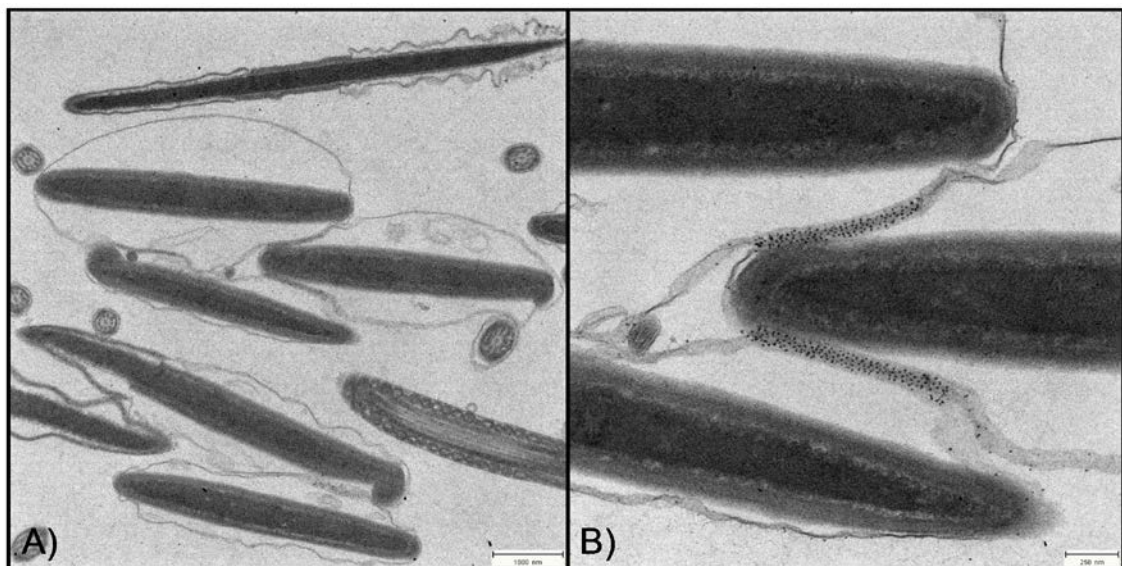


Abbildung 189: Darstellung einer repräsentativen TEM-Aufnahme von Spermien inkubiert mit AuNP-5'LNA30_{T10}-Konjugaten. Die Vergrößerung (B) zeigt die Anordnung der Partikel zwischen zwei Spermien.

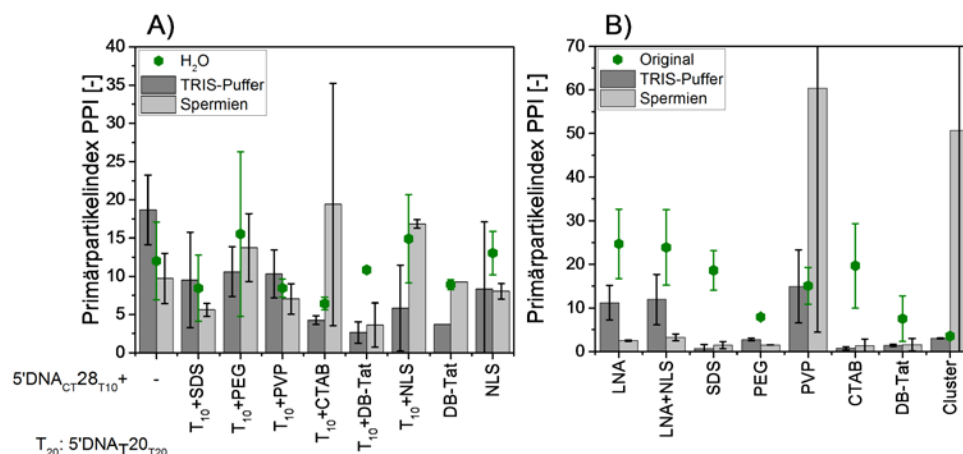


Abbildung 190: Bestimmung der Anlagerung von Konjugaten, welche mit (A) und ohne (B) DNA vor der Zugabe verschiedener anderer Liganden stabilisiert wurden, an die Spermien in Abhängigkeit verschiedener Oberflächenfunktionalisierungen. Vergleich des Primärpartikelindex nach Zugabe der Konjugate in TRIS-Puffer mit dem Primärpartikelindex, welcher sich nach Inkubation mit den Spermien in dem abgetrennten Pellet befindet.

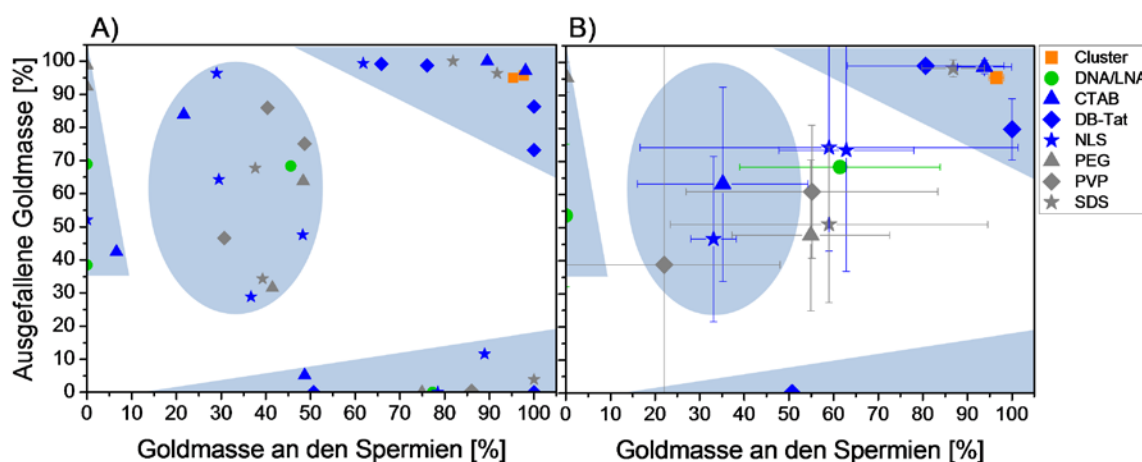


Abbildung 191: Korrelation der ausgefallenen Goldmasse (TRIS-Puffer) mit der Goldmasse, welche sich nach Inkubation mit den Spermien in dem abgetrennten Pellet befindet, unabhängig von der eingesetzten Oberflächenfunktionalisierung. Die Datenpunkte sind zum einen als Einzelwerte (A) und als Mittelwerte der Mehrfachmessung (B) für die entsprechenden Oberflächenliganden aufgetragen.

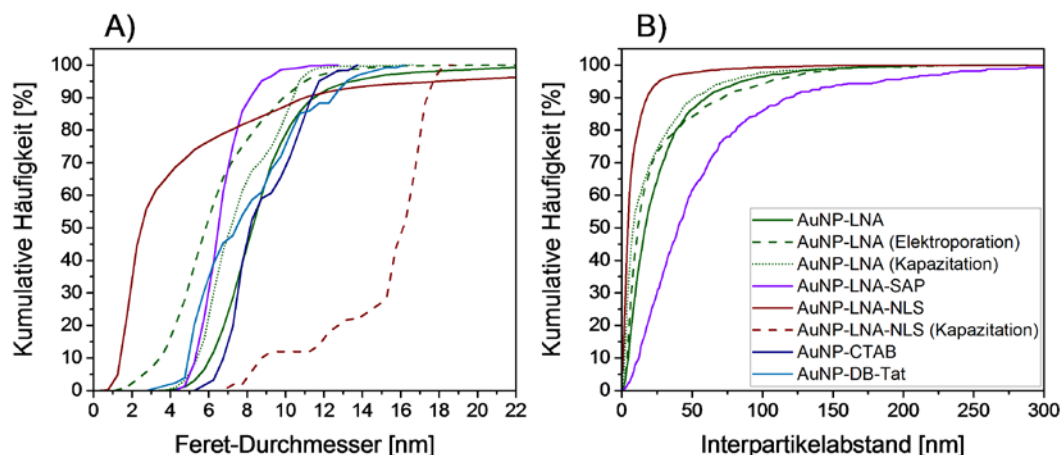


Abbildung 192: Kumulative Häufigkeitsverteilung des Feret-Durchmessers (A) und des Interpartikelabstands (B) von verschiedenen Goldnanopartikel-Konjugaten, welche sich nach der Inkubation an der Spermienmembran befinden. Die Sequenz der verwendeten LNA ist 5'LNA30T10.

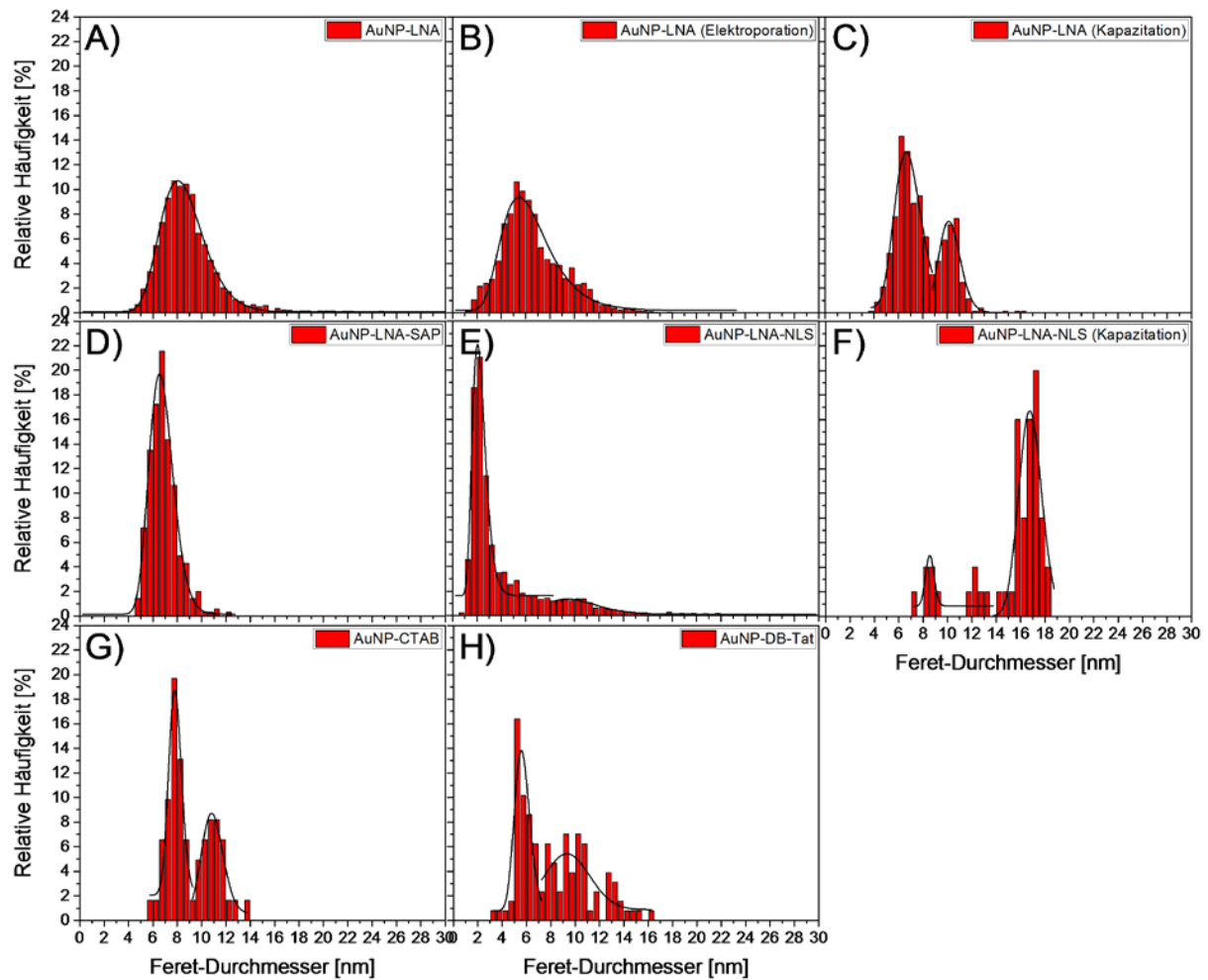


Abbildung 193: Relative Häufigkeitsverteilung des Feret-Durchmessers von verschiedenen Goldnanopartikel-Konjugaten, welche sich nach der Inkubation an der Spermienmembran befinden. Die Sequenz der verwendeten LNA ist 5'LNA30_{T10}.

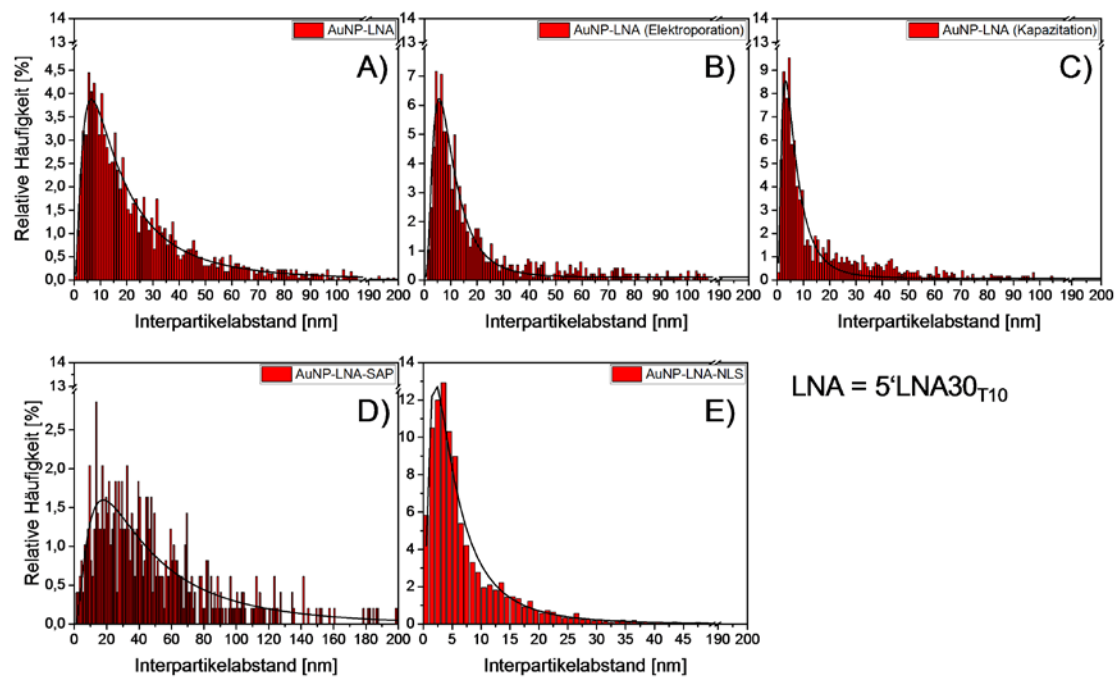


Abbildung 194: Relative Häufigkeitsverteilung des Interpartikelabstands von verschiedenen Goldnanopartikel-Konjugaten, welche sich nach der Inkubation an der Spermienmembran befinden. Die Sequenz der verwendeten LNA ist 5'LNA30_{T10}.

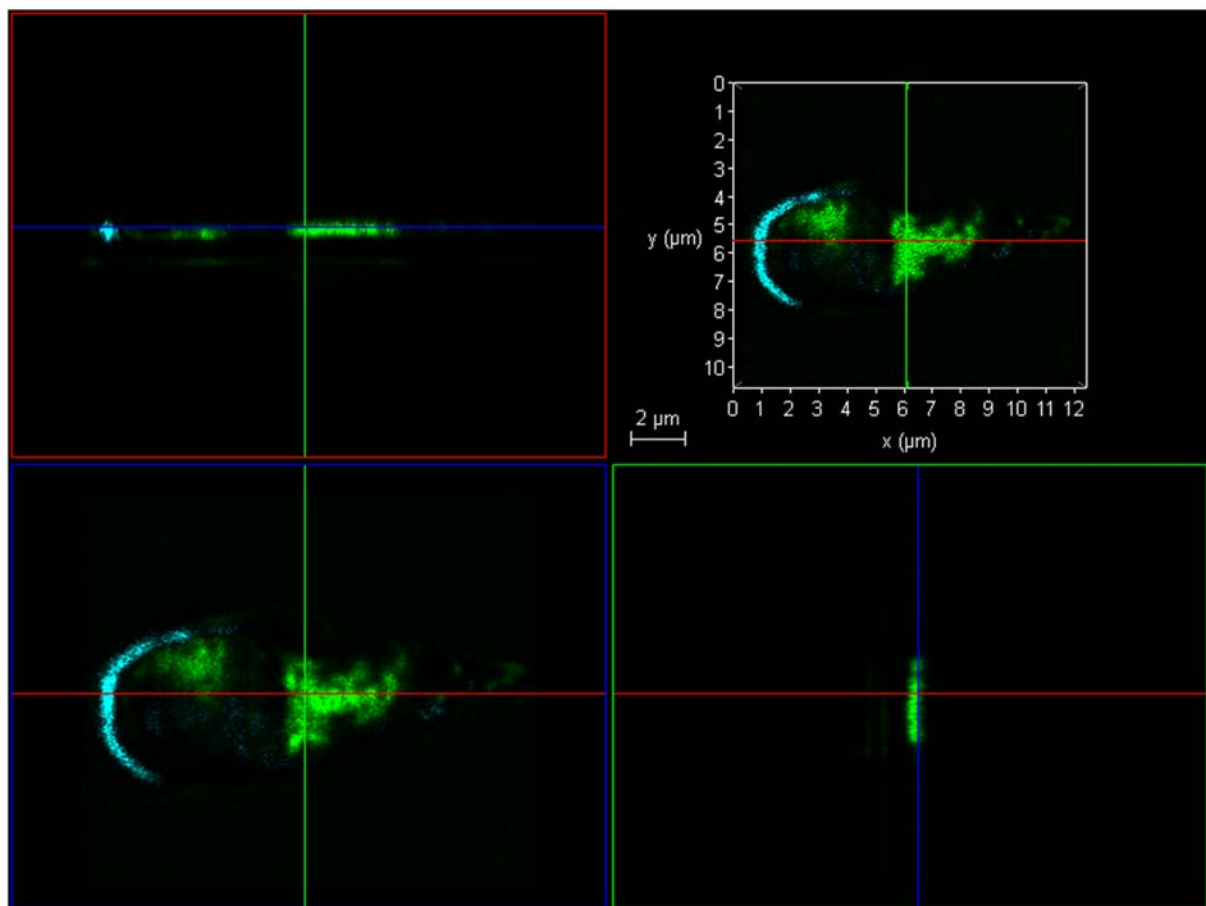


Abbildung 195: Konfokalmikroskopische Aufnahme eines Rinderspermiums, welches mit Fluorophor-markierten LNA- und NLS_{Cys}-Liganden inkubiert wurde. Die blaue Farbe stellt die AlexaFluor488-markierten LNA-Liganden dar, die grüne Farbe stellt die Fluorescein-markierten NLS_{Cys}-Liganden dar.

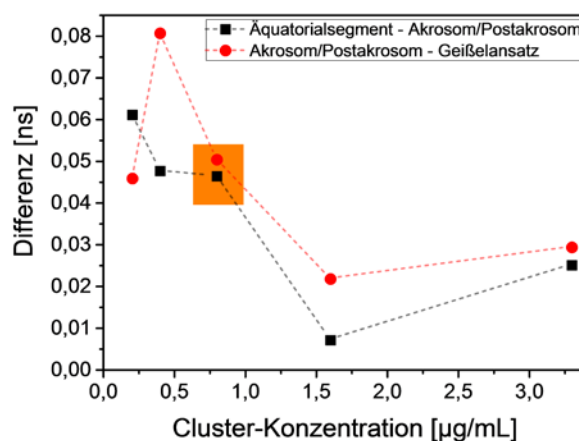


Abbildung 196: Darstellung der Differenzwerte der Fluoreszenzlebensdauer der AuNP-LNA_{Alexa488} an den verschiedenen Bereichen der Spermien in Abhängigkeit der Partikelkonzentration.

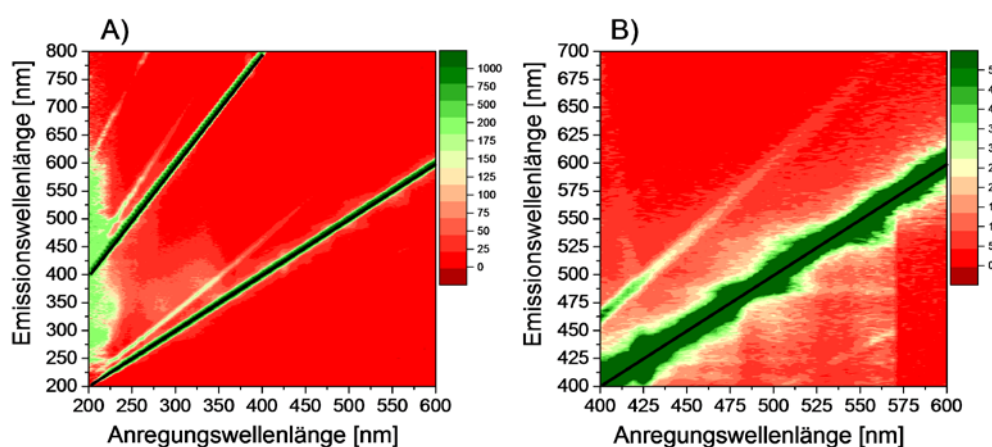


Abbildung 197: 2D-Spektrum der Anregungs- und Emissionswellenlänge von 2 nm Goldcluster in der Übersicht (A) und nach Vergrößerung des Wellenlängenbereiches. (B)

Analyse der Hybridisierungseigenschaften von Goldnanopartikel-Konjugaten

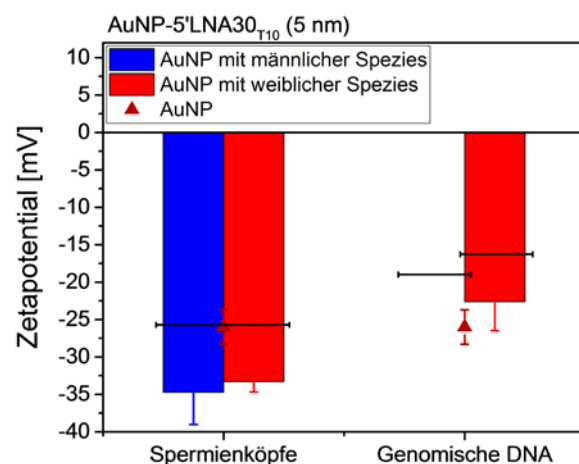


Abbildung 198: Darstellung des Zetapotentials von Goldnanopartikeln, welche mit demembranisierten Spermienköpfen und genomischer DNA inkubiert wurden.

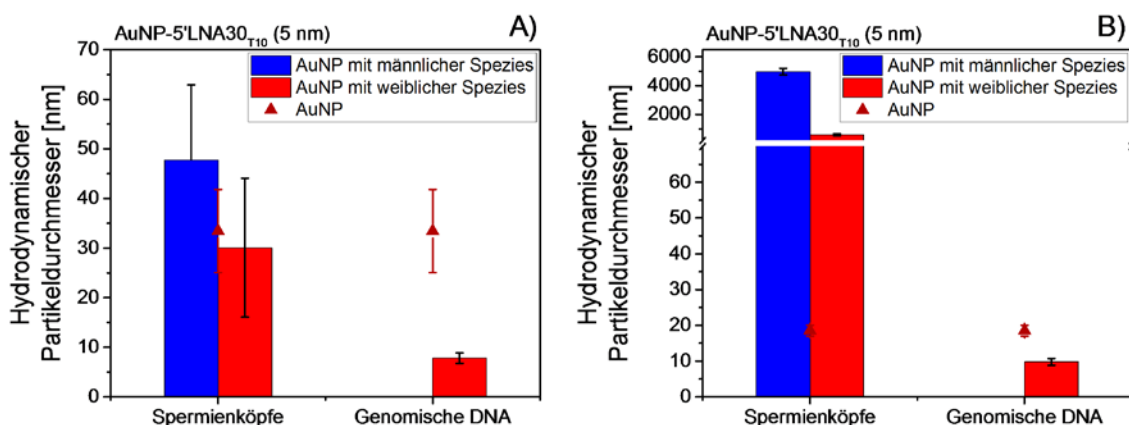


Abbildung 199: Darstellung des Hydrodynamischen Partikeldurchmessers aus der Anzahlverteilung (A) und der Volumenverteilung (B) von Goldnanopartikeln, welche mit demembraniserten Spermienköpfen und genomischer DNA inkubiert wurden.

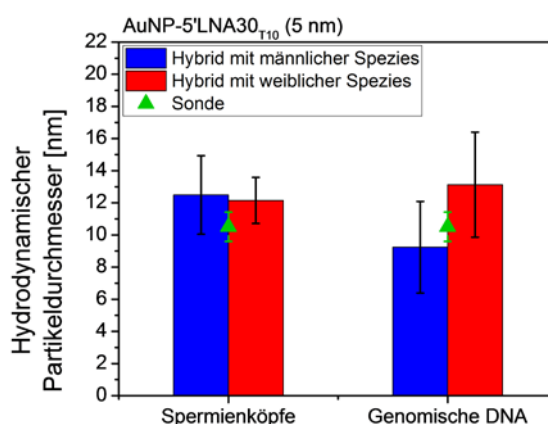


Abbildung 200: Hybridisierung von Goldnanopartikeln, welche mit LNA-Sonden funktionalisiert sind. Hydrodynamischer Partikeldurchmesser (Anzahlverteilung) von AuNP-5'LNA30_{T10}-Konjugaten nach der Hybridisierung mit demembraniserten Spermienköpfen und genomischer DNA unter Verwendung von 5 nm großen Goldnanopartikeln.

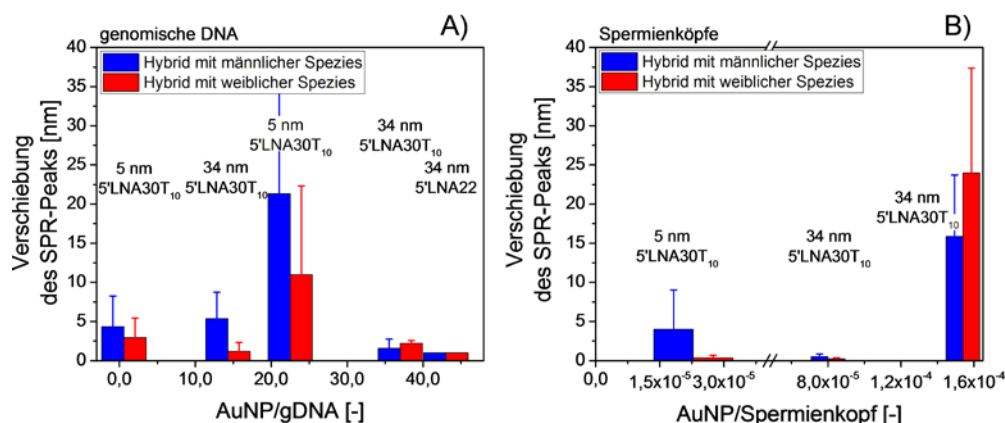


Abbildung 201: Hybridisierung von LNA-Sonden, welche an Goldnanopartikel gebunden wurden. Verschiebung des SPR-Peaks von AuNP-LNA-Konjugaten nach der Hybridisierung mit genomischer DNA (A) sowie mit demembraniserten Spermienköpfen (B) für 5 nm und 34 nm große Goldnanopartikel ebenso wie verschiedene LNA-Sequenzen. Hierbei wurde das Verhältnis AuNP/gDNA und AuNP/Spermienkopf variiert. (x-Achse) Teile der Ergebnisse stammen aus [276].⁶⁷

⁶⁷ Lisa Gamrad, Roberto Mancini, Daniel Werner, Daniela Tiedemann, Ulrike Taylor, Anna Zieff, Christoph Rehbock, Sabine Klein, Wilfried Kues, Stephan Barcikowski and Detlef Rath. Triplex-hybridizing bioconjugated gold nanoparticles for specific Y-chromosome sequence targeting of bull spermatozoa. Analyst, 2017, Accepted Manuscript. <http://dx.doi.org/10.1039/C6AN02461K>. Reproduced by permission of The Royal Society of Chemistry.

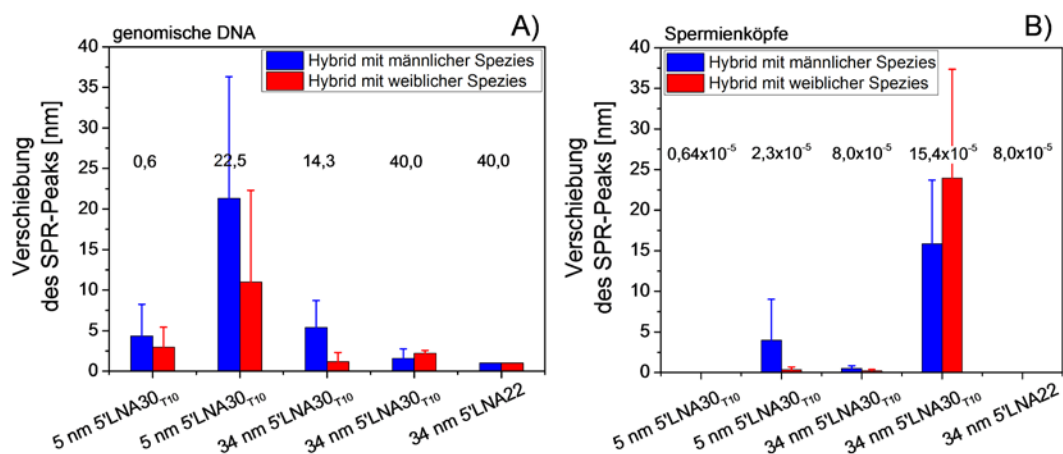


Abbildung 202: Hybridisierung von LNA-Sonden, welche an Goldnanopartikel gebunden wurden. Verschiebung des SPR-Peaks von AuNP-LNA-Konjugaten nach der Hybridisierung mit genomischer DNA (A) sowie mit demembraniserten Spermienköpfen (B) für 5 nm und 34 nm große Goldnanopartikel ebenso wie verschiedene LNA-Sequenzen. Hierbei wurde die Sequenz und die Größe der Partikel variiert. (x-Achse) Teile der Ergebnisse stammen aus [276].⁶⁷

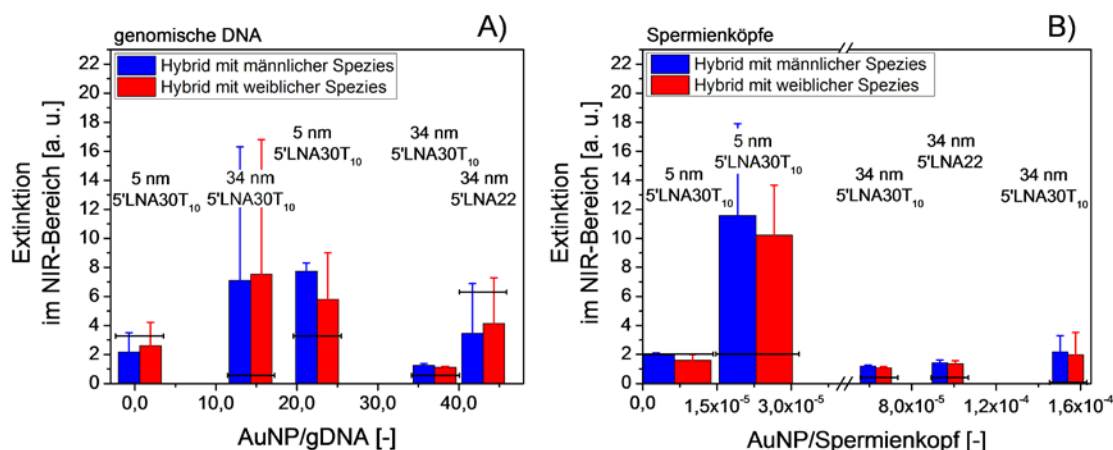


Abbildung 203: Hybridisierung von LNA-Sonden, welche an Goldnanopartikel gebunden wurden. Verschiebung des Streuanteils im NIR-Bereich von AuNP-LNA-Konjugaten nach der Hybridisierung mit genomischer DNA (A) sowie mit demembraniserten Spermienköpfen (B) für 5 nm und 34 nm große Goldnanopartikel ebenso wie verschiedene LNA-Sequenzen. Hierbei wurde das Verhältnis AuNP/gDNA und AuNP/Spermienkopf variiert. (x-Achse) Teile der Ergebnisse stammen aus [276].⁶⁷

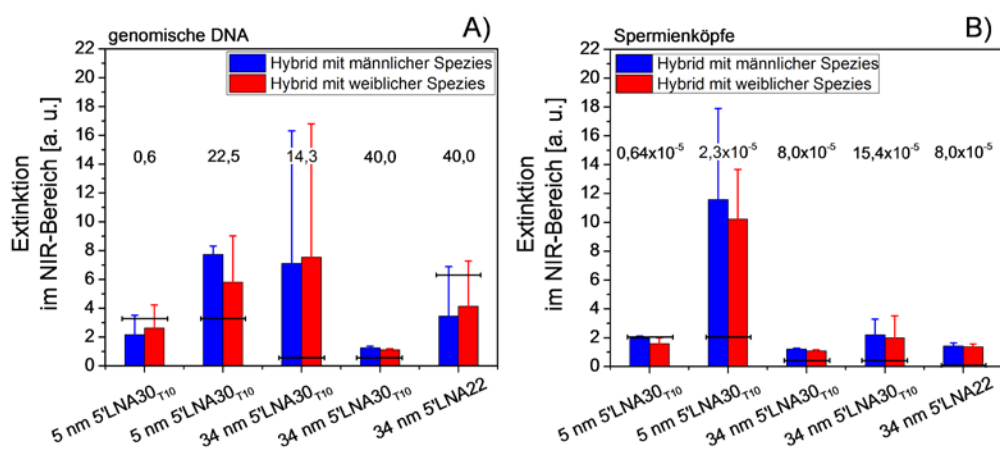


Abbildung 204: Hybridisierung von LNA-Sonden, welche an Goldnanopartikel gebunden wurden. Verschiebung des Streuanteils im NIR-Bereich von AuNP-LNA-Konjugaten nach der Hybridisierung mit genomischer DNA (A) sowie mit demembraniserten Spermienköpfen (B) für 5 nm und 34 nm große Goldnanopartikel ebenso wie verschiedene LNA-Sequenzen. Hierbei wurde die Sequenz und die Größe der Partikel variiert. (x-Achse) Teile der Ergebnisse stammen aus [276].⁶⁷

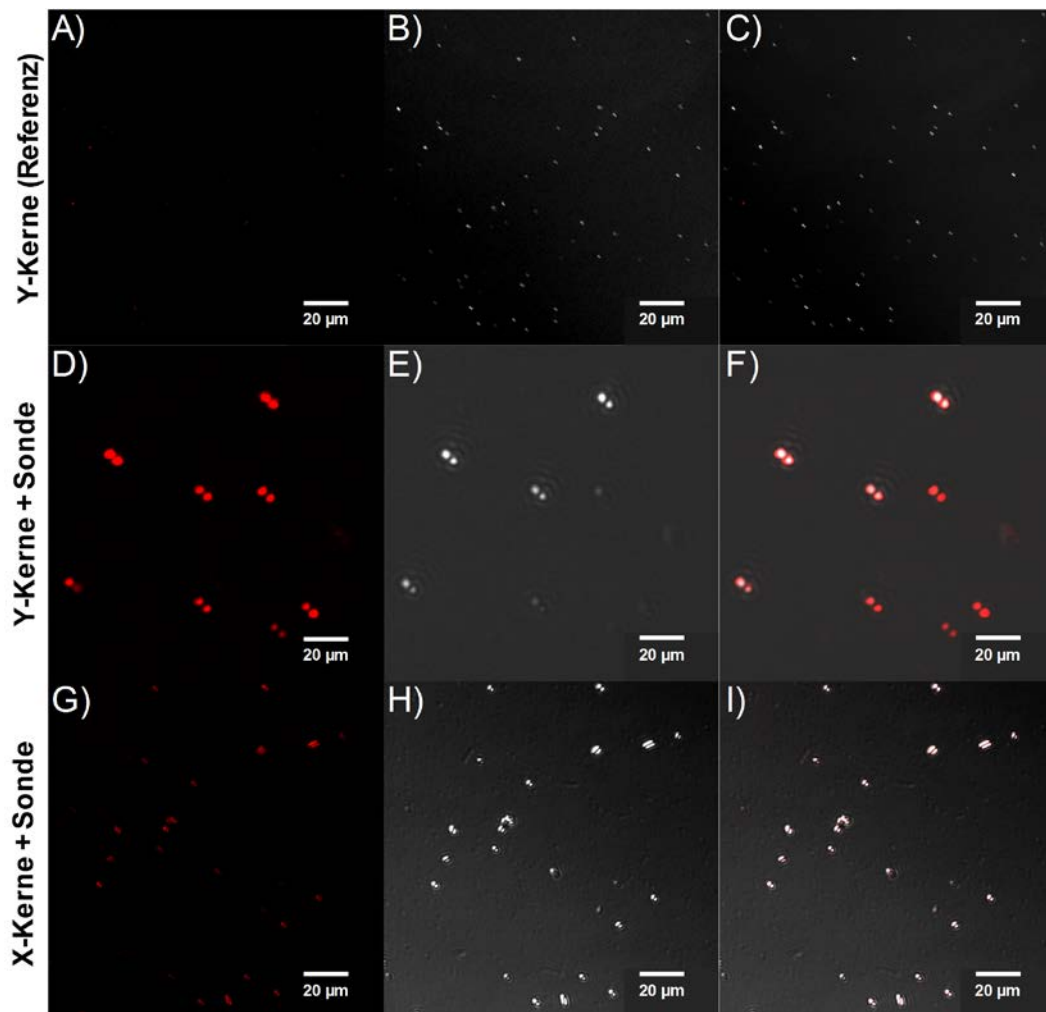


Abbildung 205: Konfokalmikroskopische Aufnahme von demembrasierten Spermienköpfen, welche mit AuNP (5 nm)-5'UNA30T10-Konjugaten inkubiert wurde. Darstellung der Reflektion (A, D, G), des differentiellen Interferenz-Kontrasts (B, E, H) und der Überlagerung der beiden Darstellungen (C, F, I) der Spermienköpfe.

7.8.12. Analyse der Aufnahmefähigkeiten von Goldnanopartikel-Konjugaten in regulatorischen T-Zellen

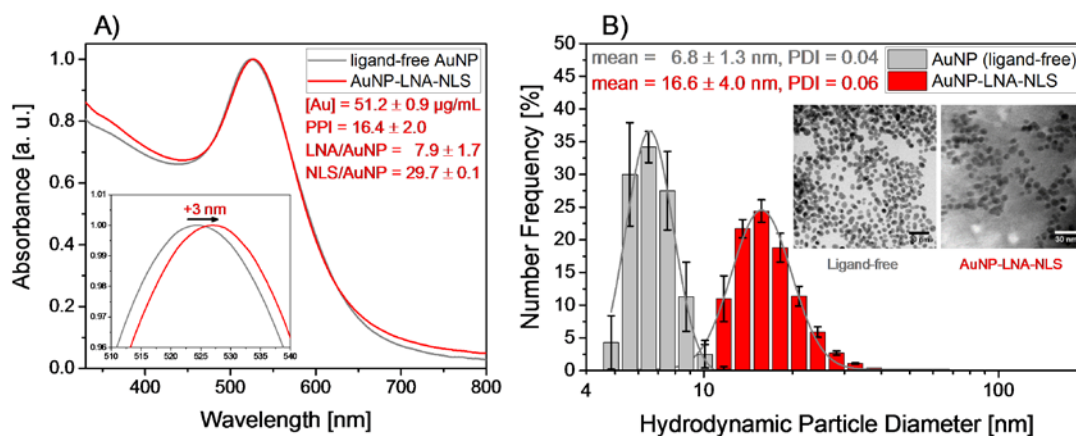


Abbildung 206: Extinktionsspektrum von Goldnanopartike-5'LNA22-NLS_{Cys}-Konjugaten im Vergleich zu ligandenfreien Goldnanopartikeln. Die Vergrößerung zeigt die Verschiebung des SPR-Peaks. (A) Darstellung der Anzahlverteilung von ligandenfreien Goldnanopartikeln und von AuNP-5'LNA22-NLS_{Cys}-Konjugaten, welche mittels Dynamische Lichtstreuung gemessen wurde. Die TEM-Bilder zeigen die entsprechenden Konjugate. (B) Die Graphik wurde von Gamrad et al. [209] übernommen.⁶⁸

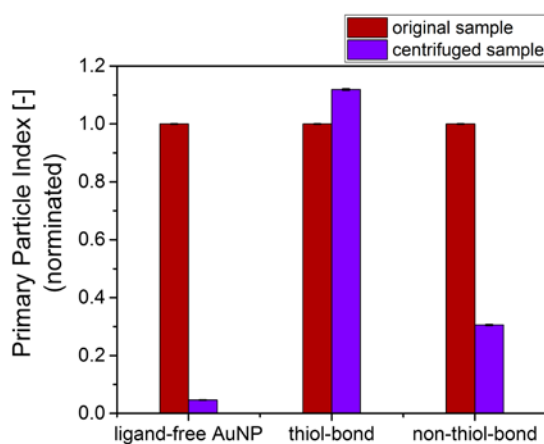


Abbildung 207: Normierte Primärpartikelindex von ligandenfreien Goldnanopartikeln und AuNP-Konjugaten, welche Peptiden mit und ohne Thiol-Gruppe hergestellt wurden. Die Proben vor und nach der Aufreinigung mittels Ultrazentrifugation werden verglichen. Die Graphik wurde von Gamrad et al. [209] übernommen.⁶⁸

⁶⁸ Lisa Gamrad, Christoph Rehbock, Astrid M. Westendorf, Jan Buer, Stephan Barcikowski and Wiebke Hansen. Efficient nucleic acid delivery to murine regulatory T cells by gold nanoparticle conjugates. *Sci. Rep.*, 6:28709: 1 – 8, 2016. <http://dx.doi.org/10.1038/srep28709>. This figure is licensed under CC BY 4.0.

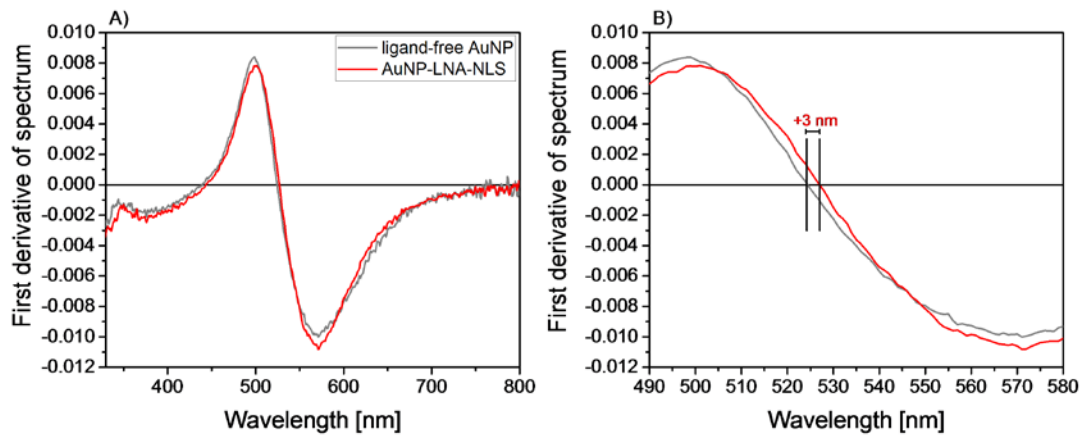


Abbildung 208: Darstellung der ersten Ableitung der UV-Vis-Spektren (A) und dessen Vergrößerung (B) von ligandenfreien Goldnanopartikeln und AuNP-5'LNA22-NLS_{Cys}. Die Graphik wurde von Gamrad et al. [209] übernommen.⁶⁸

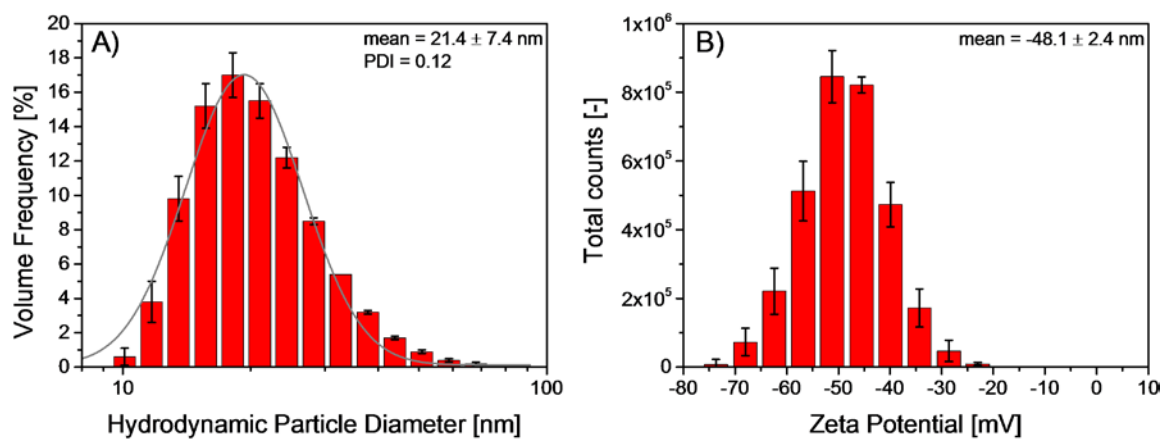


Abbildung 209: Charakterisierung der Goldnanopartikel-Konjugate. Darstellung der Volumen-häufigkeit der Konjugate (A) und der der Zetapotential-Verteilung (B), welche mittels Dynamischer Lichtstreuung gemessen wurde. Die Graphik wurde von Gamrad et al. [209] übernommen.⁶⁸

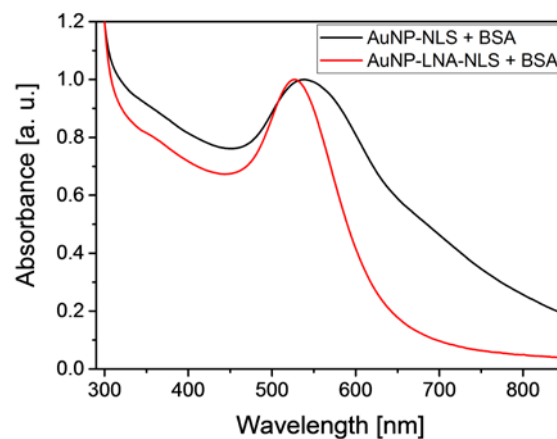


Abbildung 210: Extinktionsspektrum von AuNP-NLS_{Cys} + BSA und AuNP-5'LNA22-NLS_{Cys} + BSA. Dies Spektren zeigen, dass ohne Verwendung der LNA eine Verbreiterung des SPR-Peaks auftritt. Die Graphik wurde von Gamrad et al. [209] übernommen.⁶⁸

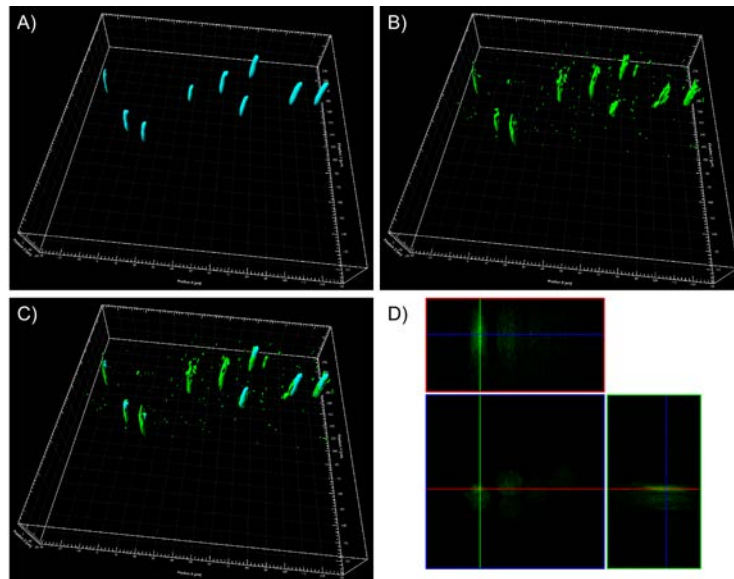


Abbildung 211: Konfokalmikroskopische Aufnahmen von AuNP-LNA-NLS_{Cys}-Konjugaten aufgenommen von regulatorischen T-Zellen CD25+. A) Darstellung des Zellkerns der T-Zellen durch eine Färbung mittels DAPI in hellblau. B) Darstellung der Nanopartikel durch eine Markierung der Liganden mit Alexa₄₈₈ in grün. C) Überlagerung der Aufnahmen der Nanopartikel und der Zellen. D) Darstellung der Aufnahme der aufgenommenen Partikel im Querschnitt der Zelle. Die Graphik wurde von Gamrad et al. [209] übernommen.⁶⁸

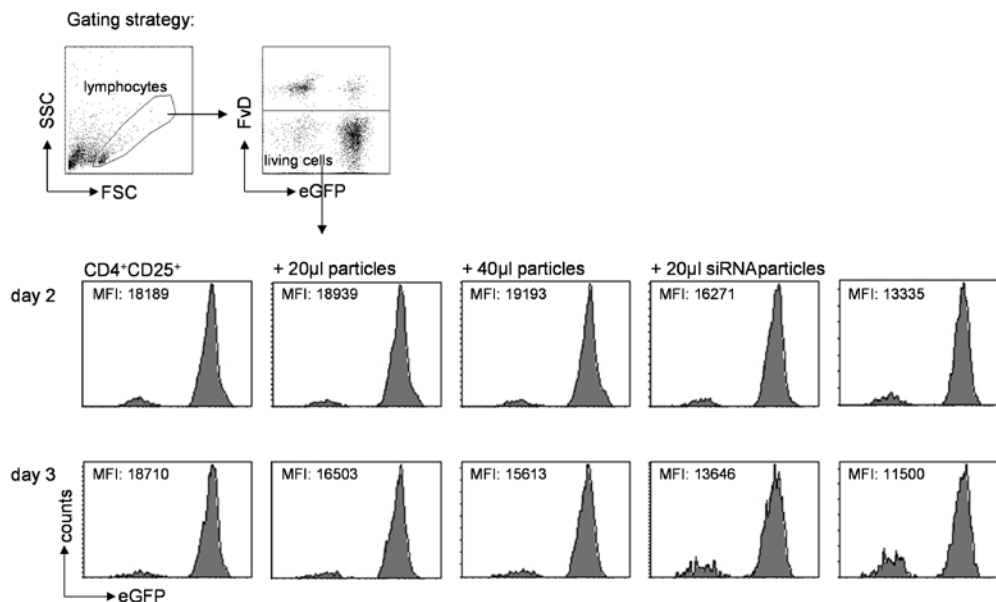


Abbildung 212: Gating-Strategie und repräsentative Histogramme für die Analyse der eGFP-exprimierenden CD4⁺CD25⁺ Tregs mittels Durchflusszytometrie. CD4⁺CD25⁺ Tregs wurden aus Fox3/eGFP Reportermäusen isoliert und mit und ohne ligandenfreie und siRNA-funktionalisierte Goldnanopartikel-Konjugate für zwei und drei Tage inkubiert. Die Analyse erfolgte über das Auslesen der eGFP-Expression als MFI (Mittlerer Fluoreszenzintensität), bezogen auf lebende Zellen, mittels Durchflusszytometrie. Die Graphik wurde von Gamrad et al. [209] übernommen.⁶⁸

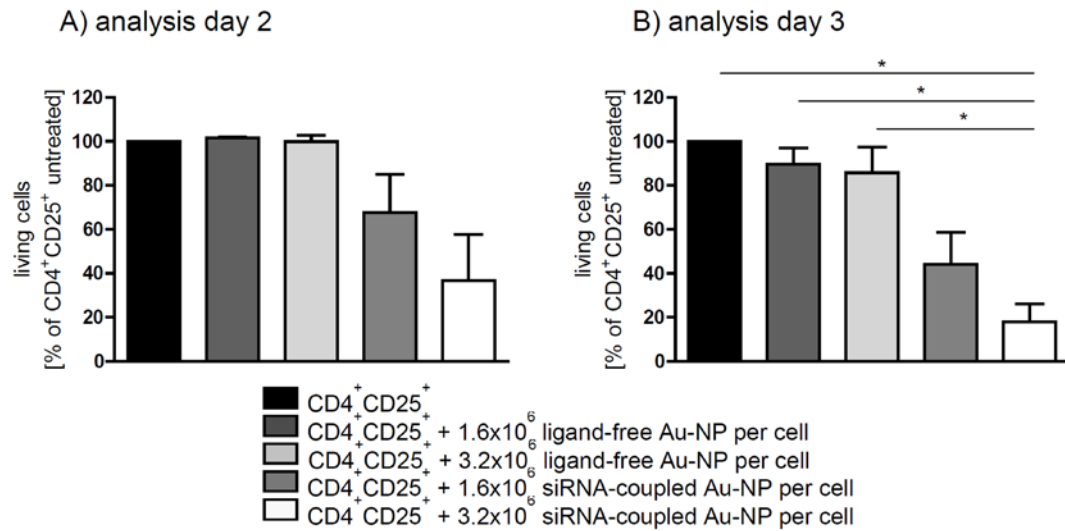


Abbildung 213: Überlebensrate von siRNA-funktionalisierten Goldnanopartikelkonjugaten, welche mit CD4⁺CD25⁺ regulatorische T-Zellen. Frisch isolierte eGFP⁺ regulatorische T-Zellen werden in An- oder Abwesenheit von $1,6 \cdot 10^6$ oder $3,2 \cdot 10^6$ AuNP-5'LNA22-NLS_{Cys}+siRNA pro Zelle oder ligandenfreien Konjugaten als Kontrolle für zwei (A) oder drei (B) Tage inkubiert. Die Zellen wurden geerntet und mit einem fixierenden Viabilitätsfarbstoff (eFluor780) eingefärbt. Die Menge der lebenden Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Die Ergebnisse von drei unabhängigen Experimenten wurden als Mittelwert \pm SEM angegeben. Es wurde eine Varianzanalyse mit nachfolgendem Bonferroni's-Test durchgeführt, um die statistische Relevanz zu ermitteln. * $p < 0,05$. Die Graphik wurde von Gamrad et al. [209] übernommen.⁶⁸

7.8.13. Endosomale Aufnahme von Goldnanopartikel-Konjugaten und deren gezielte Freisetzung

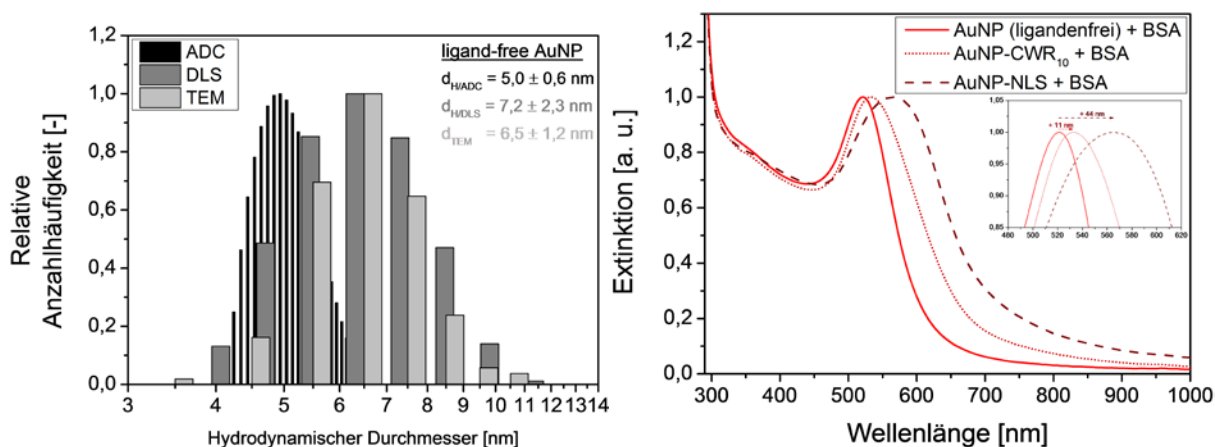


Abbildung 214: Darstellung der relativen Anzahlhäufigkeitsverteilung von ligandenfreien Goldnanopartikeln. Der Vergleich zwischen Analytischer Scheibenzentrifuge, Dynamischer Lichtstreuung und TEM weist im Rahmen der Standardabweichung ähnliche Werte auf. (A)

Vergleich der SPR-Peaks von ligandenfreien Goldnanopartikeln und Agglomeraten, welche mit CWR₁₀ und NLS_{Cys} hergestellt wurden. (B) Die Graphik wurde von Krawinkel et al. [223] übernommen.⁶⁹

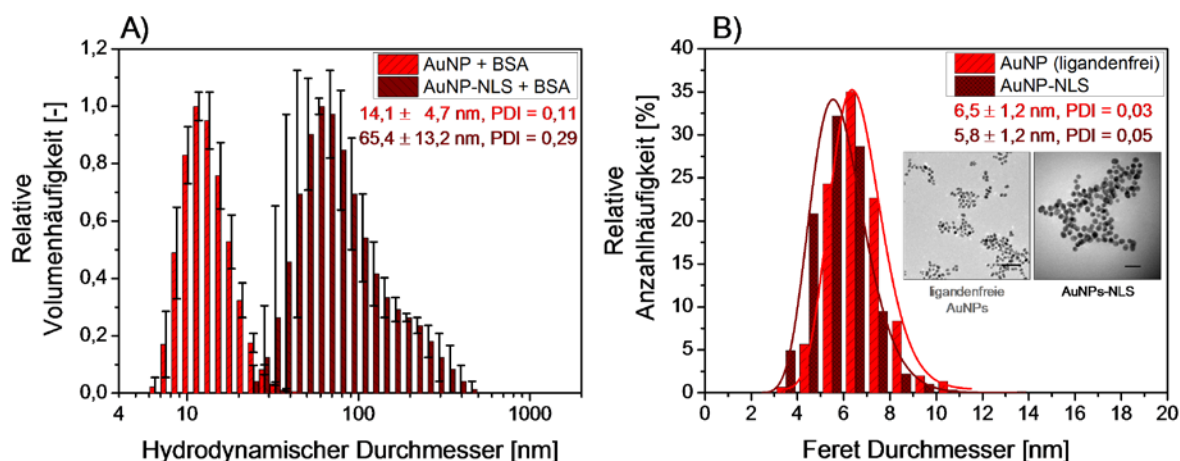


Abbildung 215: Charakterisierung von ligandenfreien Goldnanopartikeln und AuNP-CPP-Agglomeraten. Darstellung der relativen Volumenhäufigkeitsverteilung von ligandenfreien AuNPs und AuNP-CPP-Agglomeraten (jeweils mit BSA stabilisiert), welche mittels Dynamischer Lichtstreuung gemessen wurden. (A) Darstellung der relativen Anzahlhäufigkeitsverteilung von agglomerierten (AuNP-NLS_{Cys}) und primären, ligandenfreien Goldnanopartikeln, welche mittels TEM ermittelt wurden. Repräsentative TEM-Bilder zeigen die Partikel. (Maßbalken: links 50 nm, rechts 20nm) (B) Die Graphik wurde von Krawinkel et al. [223] übernommen.⁶⁹

⁶⁹ Judith Krawinkel, Undine Richter, Maria Leilani Torres-Mapa, Martin Westermann, Lisa Gamrad, Christoph Rehbock, Stephan Barcikowski and Alexander Heisterkamp. Optical and electron microscopy study of laser-based intracellular molecule delivery using peptide-conjugated photodispersible gold nanoparticle agglomerates. *J. Nanobiotechnol.*, 14 (2):1 – 14, 2016. <http://dx.doi.org/10.1186/s12951-015-0155-8>. This figure is used under CC BY 4.0 / Adapted from original.

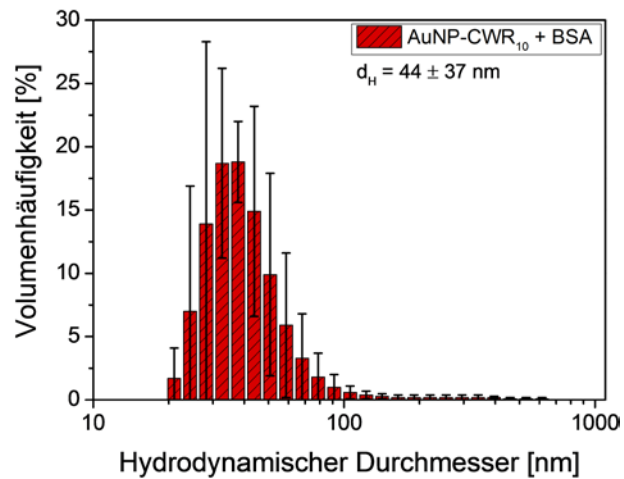


Abbildung 216: Darstellung der Volumenhäufigkeit von AuNP-CWR₁₀-Konjugaten, welche mit BSA stabilisiert wurden. Die Graphik wurde von Krawinkel et al. [223] übernommen.⁶⁹

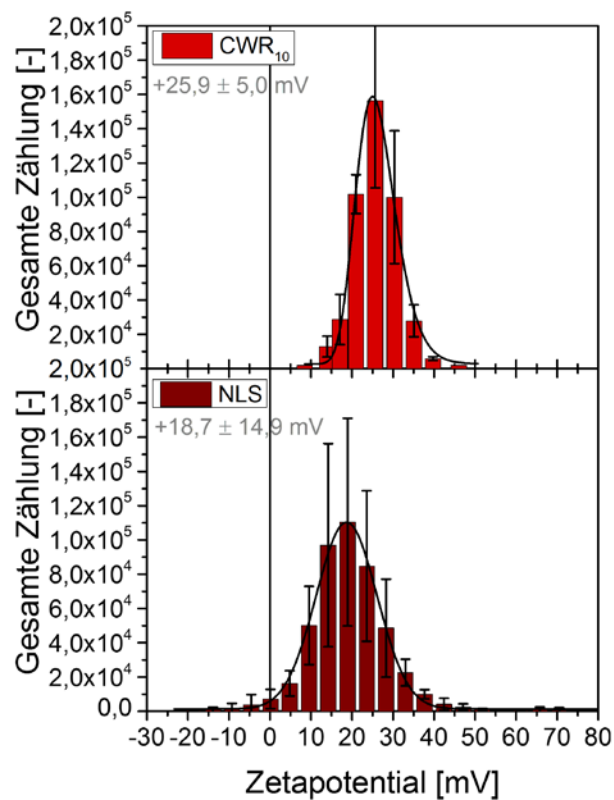


Abbildung 217: Darstellung der Zählratenverteilung aus der Zetapotentialmessung von AuNP-CWR₁₀- und AuNP-NLS_{cys}-Konjugaten. Die Graphik wurde von Krawinkel et al. [223] übernommen.⁶⁹

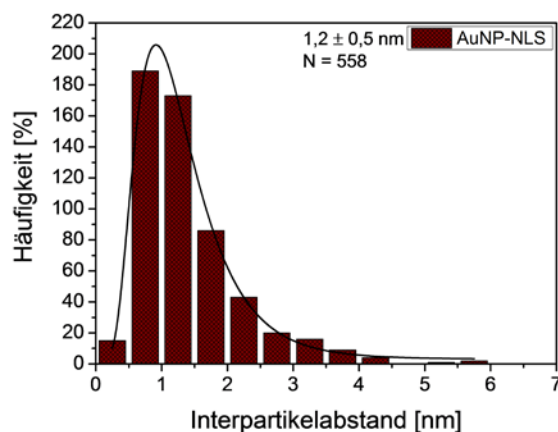


Abbildung 218: Darstellung der Häufigkeitsverteilung des Interpartikelabstands von AuNP-NLS_{Cys}-Konjugaten, welcher aus der TEM-Analyse ermittelt wurde. Die Graphik wurde von Krawinkel et al. [223] übernommen.⁶⁹

Zelluläre Aufnahme der Agglomerate

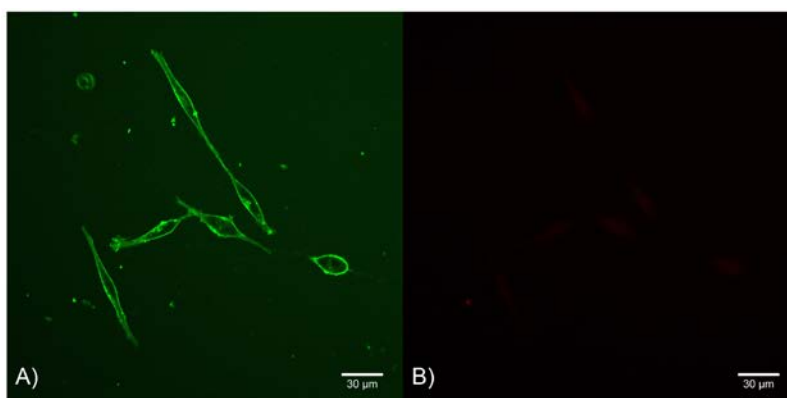


Abbildung 219: Multiphotonenmikroskopie-Bilder von Zellen mit ligandenfreien AuNP: Mit CellMaskOrange angefärbte Zellmembran, um die Zellen und die Nanopartikel sichtbar zu machen. (A) Lumineszenz der Goldnanopartikel-Agglomerate, welche bei 720 nm angeregt wird und die Zellmembran nicht sichtbar ist. (B) Im Vergleich zu agglomerierten Partikel kann hier keine Aufnahme der Partikel in die Zellen detektiert werden. Die Graphik wurde von Gamrad et al. [72] übernommen.⁷⁰

⁷⁰ Adapted with permission from Lisa Gamrad, Christoph Rehbock, Judith Krawinkel, Bayaraah Tumursukh, Alexander Heisterkamp and Stephan Barcikowski. Charge Balancing of Model Gold-Nanoparticle-Peptide Conjugates Controlled by the Peptide's Net Charge and the Ligand to Nanoparticle Ratio. *J. Phys. Chem. C*, 118 (19), 10302 – 10313, 2014. Copyright 2014 American Chemical Society. (<http://dx.doi.org/10.1021/jp501489t>)

Molekül-Freisetzung und Bestimmung der optimalen Laser-Fluenz

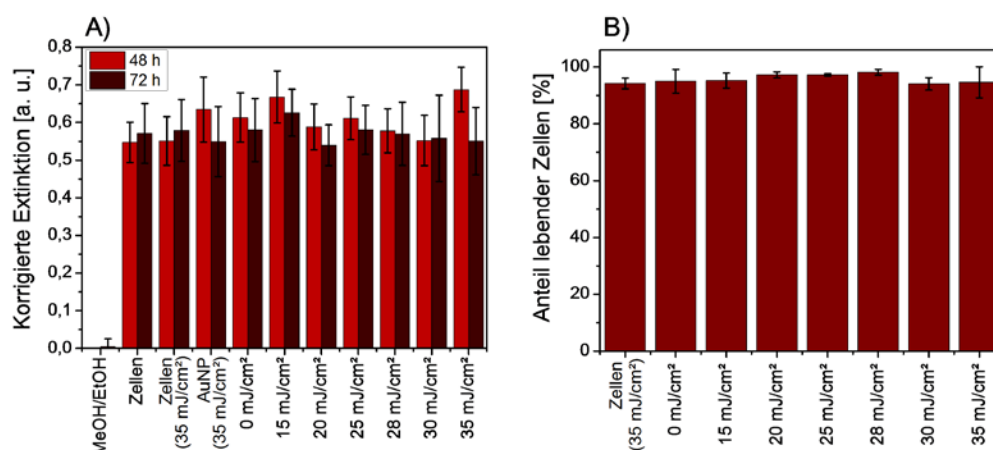


Abbildung 220: Metabolische Aktivität der Zellen. Langfristiger Einfluss der Laserbestrahlung für verschiedene Fluenzen auf die Viabilität der Zellen, welche 48h und 72 h nach der Laserbestrahlung mittels PrestoBlue getestet wurde. (A) Darstellung der Menge an lebenden Zellen 10 Minuten nach der Laserbestrahlung für verschiedene Fluenzen. Die lebenden Zellen wurden mit Calcein AM und die toten Zellen mit Propidiumiodid angefärbt. (B) Die Graphik wurde von Krawinkel et al. [223] übernommen.⁶⁹

Bestrahlung von AuNP-CPP-Agglomeraten innerhalb und außerhalb von Zellen

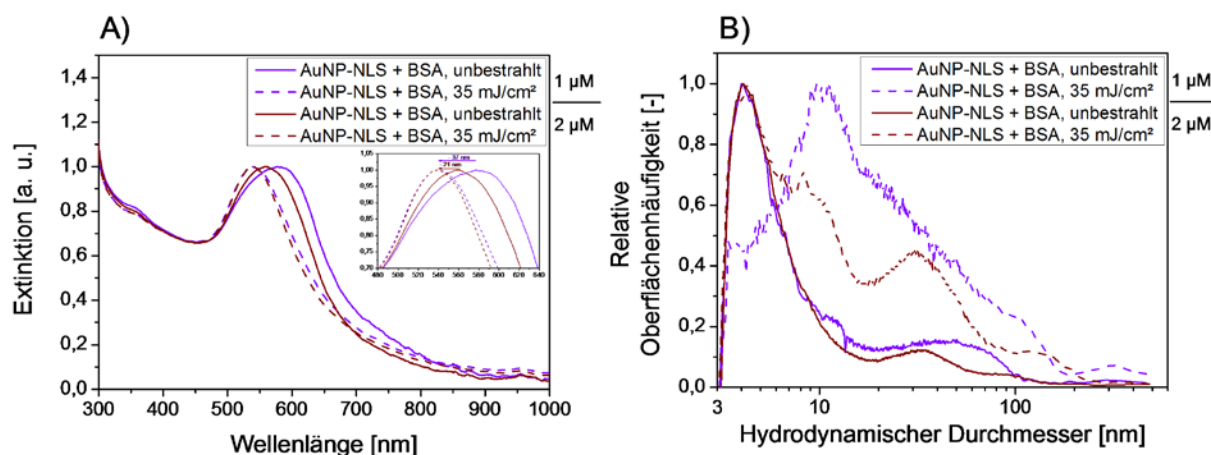


Abbildung 221: Extinktionsspektren (A) und Relative Oberflächenhäufigkeitsverteilung (B) für die Konjugate AuNP-NLS_{Cys} mit 1 µM und 2 µM Peptid vor und nach der Laserbestrahlung mit 35 mJ/cm².

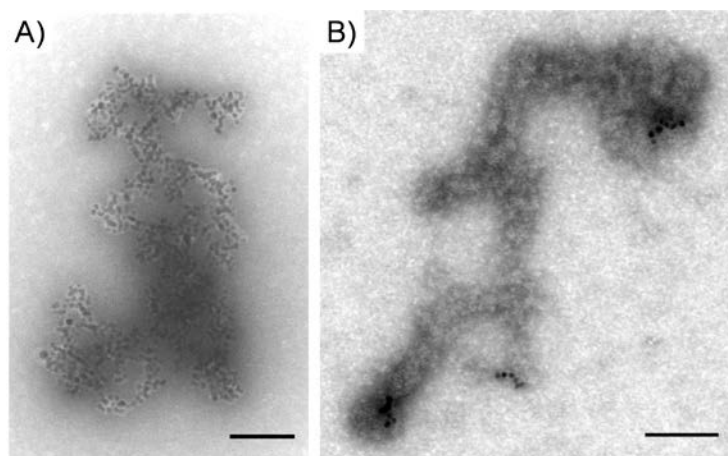


Abbildung 222: TEM-Aufnahme von AuNP-CPP-Agglomeraten in Lösung vor (A) und nach (B) der Laserbestrahlung mit 35 mJ/cm^2 . Maßbalken: 100 nm. Die Graphik wurde von Krawinkel et al. [223] übernommen.⁶⁹

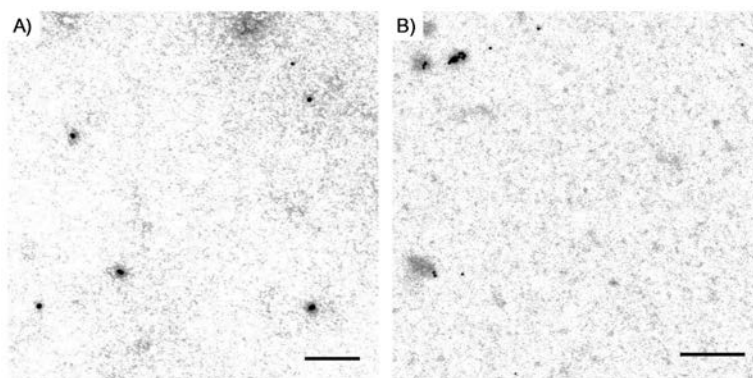


Abbildung 223: Beispielhafte TEM-Bilder von ligandenfreien Goldnanopartikeln (A) und AuNP-CPP-Konjugaten (B) nach der Laserbestrahlung mit 35 mJ/cm^2 . Maßbalken: 100 nm (A), 200 nm (B) Die Graphik wurde von Krawinkel et al. [223] übernommen.⁶⁹

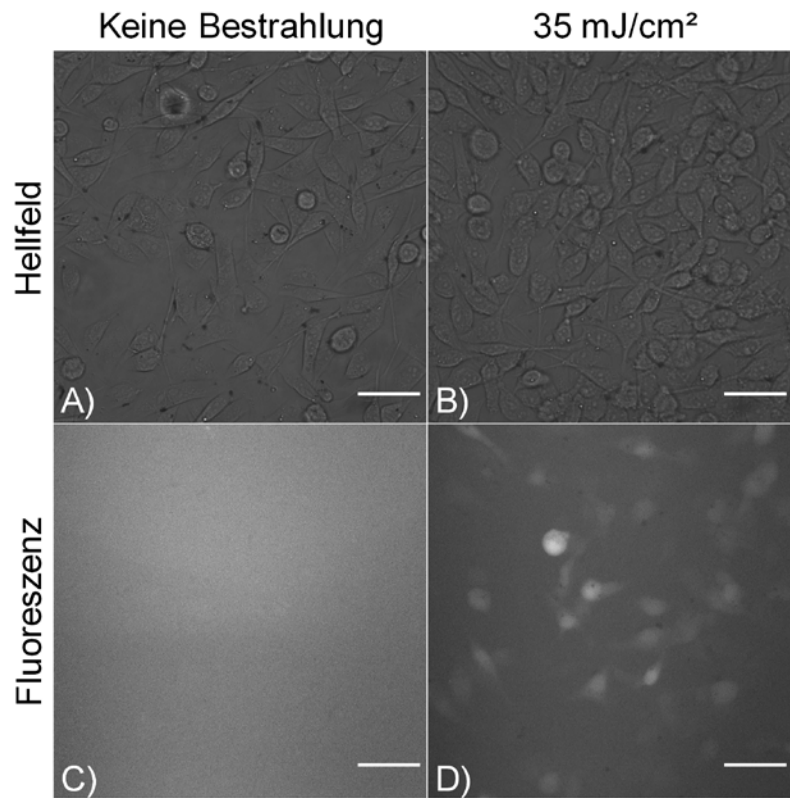


Abbildung 224: Freisetzung von Goldnanopartikeln aus Endosomen in das umgebende Zytoplasma nach Bestrahlung von FITC-markierten AuNP-CPP-Agglomeraten. Hellfeld- (A, B) und Fluoreszenzmikroskopische (C, D) Aufnahmen wurden von den Zellen ohne Bestrahlung (A, C) und nach Bestrahlung mit 35 mJ/cm^2 (B, D) durchgeführt. Die eingezeichneten Maßbalken entsprechen $40 \mu\text{m}$.



Abbildung 225: Beispielhaftes TEM-Bild einer Zelle, welche 4 Stunden mit ligandenfreien Goldnanopartikeln inkubiert wurde. Lediglich vereinzelte Goldnanopartikel können innerhalb der Zelle (roter Kreis) gefunden werden. Maßbalken: 500 nm . Die Graphik wurde von Krawinkel et al. [223] übernommen.⁶⁹

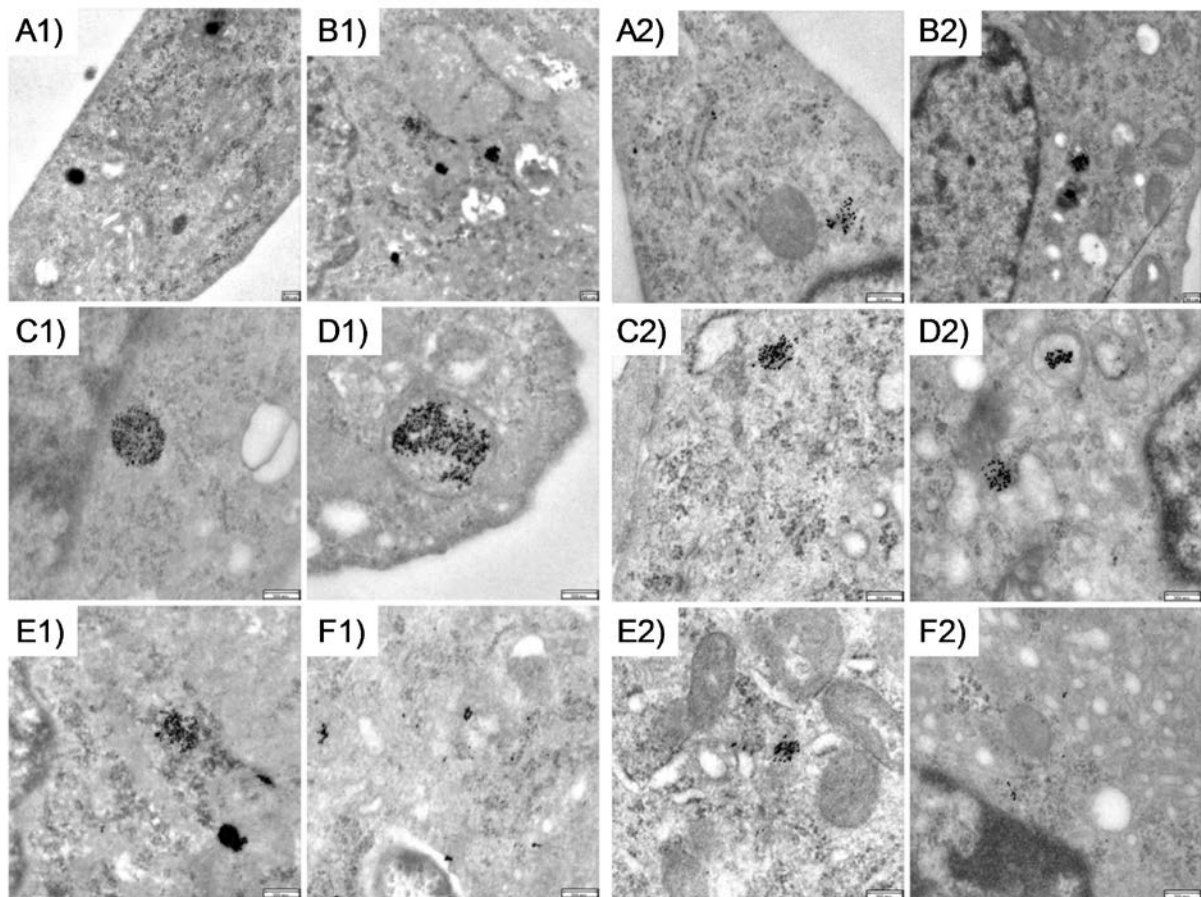


Abbildung 226: ZMTH3-Zellen mit intraendosomal AuNP-NLS_{Cys}-Agglomeraten nach der Bestrahlung mit 25 mJ/cm² (A1 – F1) und mit 35 mJ/cm² (A2 – F2). Maßbalken: 200 nm. Die Graphik wurde von Krawinkel et al. [223] übernommen.⁶⁹

Bestrahlung von AuNP-CPP-Agglomeraten (+ Plasmid) innerhalb und außerhalb von Zellen

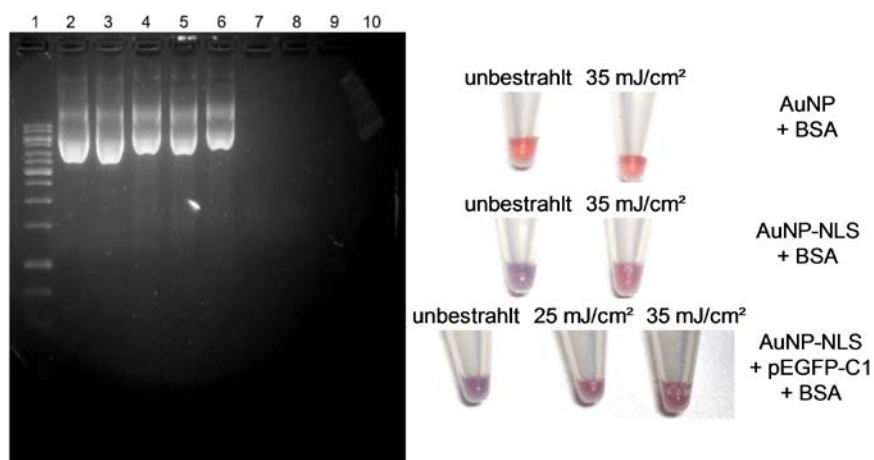


Abbildung 227: Intraendosomale Optoporation zur Transfektion. AuNP-NLS_{Cys}-Agglomerate wurden mit einem Plasmid inkubiert und mit einer Fluenz von 25 mJ/cm² und 35 mJ/cm² bestrahlt. Links sind die Plasmid-Banden aus der Gel-Elektrophorese zu sehen. (1: DNA-Leiter; 2: Plasmid, unbestrahlt; 3: Plasmid + 35 mJ/cm²; 4: AuNP-NLS_{Cys} + Plasmid, unbestrahlt; 5: AuNP-NLS_{Cys} + Plasmid, 25 mJ/cm²; 6: AuNP-NLS_{Cys} + Plasmid, 35 mJ/cm²; 7: AuNP-NLS_{Cys} + BSA, unbestrahlt; 8: AuNP-NLS_{Cys} + BSA, 25 mJ/cm²; 9: AuNP + BSA, unbestrahlt; 10: AuNP + BSA, 35 mJ/cm²) Rechts sind die Proben vor und nach der Bestrahlung zu sehen.

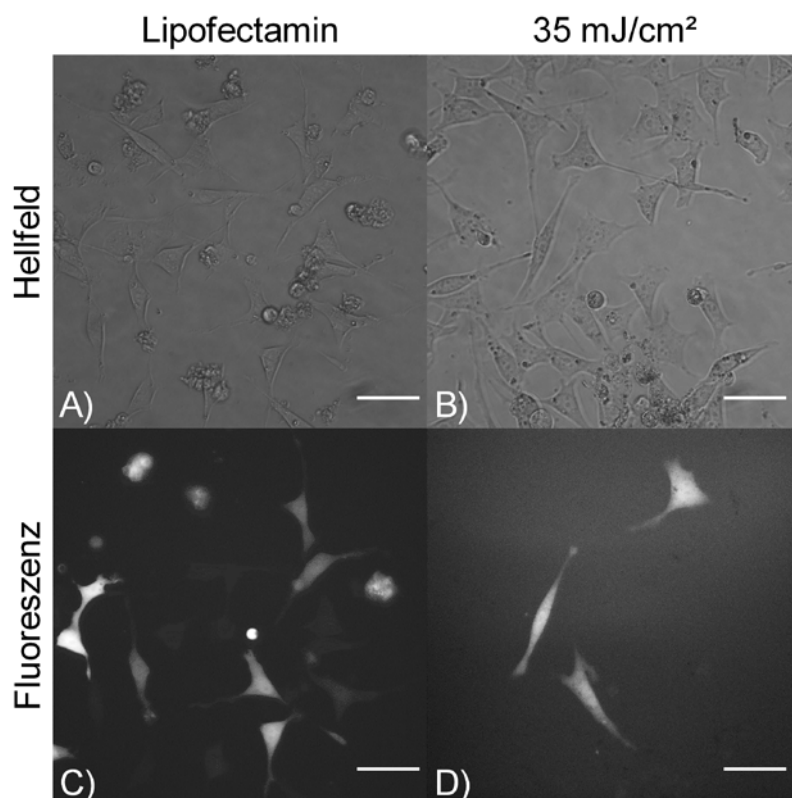


Abbildung 228: Darstellung der Freisetzung des Plasmids pEGFP-C1 in ZMTH3-Zellen mittels Lipofectamin (A, C) und Laser-Bestrahlung (B, D). Es wurden Hellfeld- (A, B) und Fluoreszenzmikroskopische (C, D) Aufnahmen von den Zellen nach der Plasmid-Freisetzung durchgeführt. Die eingezeichneten Maßbalken entsprechen 50 μm .

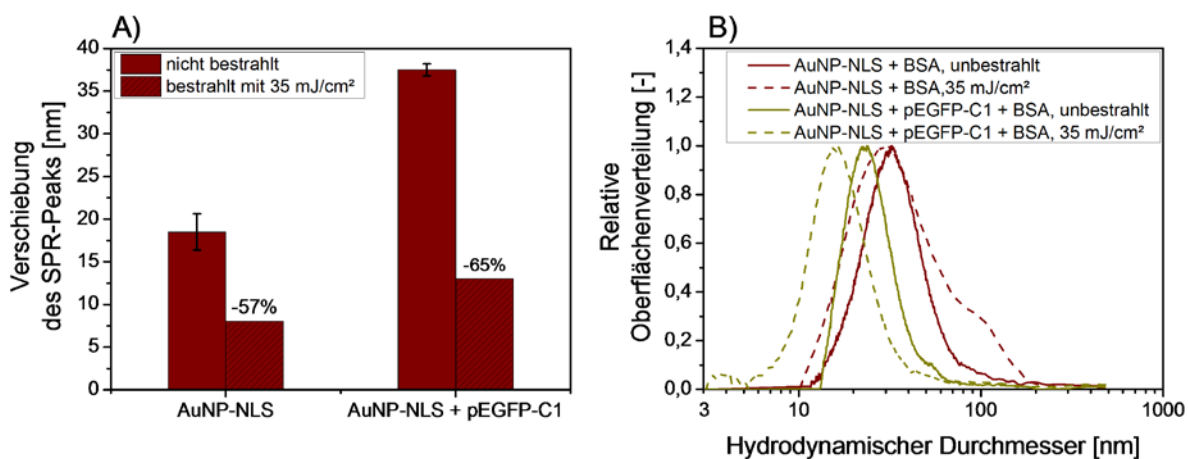


Abbildung 229: Effekt der Laser-Bestrahlung auf AuNP-CPP-Plasmid-Agglomerate. Darstellung der Verschiebung des SPR-Peaks (A) und der Größenverteilung (B) vor und nach der Bestrahlung von AuNP-CPP-Plasmid-Agglomeraten mit 35 mJ/cm².

7.9. Lebenslauf

**Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht
enthalten.**

7.10. Publikationsliste

Begutachtete Publikationen als Erstautor

1. **Gamrad, L.**; Mancini, R.; Werner, D.; Tiedemann, D.; Taylor, U.; Ziefus, A.; Rehbock, C.; Klein, S.; Kues, W.; Barcikowski, S. & Rath, D.: Triplex-hybridizing bioconjugated gold nanoparticles for specific Y-chromosome sequence targeting of bull spermatozoa. *Analyst*, **2017**, akzeptiertes Manuskript, <http://dx.doi.org/10.1039/C6AN02461K>.
2. **Gamrad, L.**; Rehbock, C.; Westendorf, A. M.; Buer, J.; Barcikowski, S. & Hansen, W.: Efficient nucleic acid delivery to murine regulatory T cells by gold nanoparticle conjugates. *Scientific Reports*, **2016**, 6:28709, 1-8.
3. **Gamrad, L.**; Rehbock, C.; Krawinkel, J.; Tumursukh, B.; Heisterkamp, A.; Barcikowski, S.: Charge Balancing of Model Gold-Nanoparticle-Peptide Conjugates Controlled by the Peptide's Net Charge and the Ligand to Nanoparticle Ratio. *Journal of Physical Chemistry C*, **2014**, 118, 10302-103313.

Begutachtete Publikationen als Koautor

4. Sprengel, A.; Lill, P.; Stegemann, P.; Bravo-Rodriguez, K.; Schöneweiß, E.-C.; Merdanovic, M.; Gudnason, D.; Aznauryan, M.; **Gamrad, L.**; Barcikowski, S.; Sanchez-Garcia, E.; Birkedal, V.; Gatsogiannis, C.; Ehrmann, M.; Saccà, B.: Tailored protein encapsulation into a DNA host using geometrically organized supramolecular interactions. *Nature Communications*, **2016**, 14472:1-12.
5. Blaeser, A.; Million, N.; Duarte Campos, D. F.; **Gamrad, L.**; Koepf, M.; Rehbock, C.; Nachev, M.; Sures, B.; Barcikowski, S. & Fischer, H.: Laser-based in situ embedding of metal nanoparticles into bioextruded alginate hydrogel tubes enhances human endothelial cell adhesion. *Nano Research*, **2016**, 1-21.
6. Alele, N.; Streubel, R.; **Gamrad, L.**; Barcikowski, S. & Ulbricht, M.: Ultrafiltration membrane-based purification of bioconjugated gold nanoparticle dispersions. *Separation and Purification Technology*, **2016**, 157, 120-130.
7. Krawinkel, J.; Richter, U.; Torres-Mappa, M. L.; Westermann, M.; **Gamrad, L.**; Rehbock, C.; Barcikowski, S. & Heisterkamp, A.: Optical and electron microscopy study of laser-based intracellular molecule delivery using peptide-conjugated photodispersible gold nanoparticle agglomerates. *Journal of Nanobiotechnology*, **2016**, 14:2, 1-14.
8. Barchanski, A.; Taylor, U.; Sajti, C. L.; **Gamrad, L.**; Kues, W. A.; Rath, D.; Barcikowski, S.: Bioconjugated Gold Nanoparticles Penetrate Into Spermatozoa Depending on Plasma Membrane Status. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, **2015**, 11, 1597-1607.
9. Rath, D.; Tiedemann, D.; **Gamrad, L.**; Johnson, L.; Klein, S.; Kues, W.; Mancini, R.; Rehbock, C.; Taylor, U. & Barcikowski, S.: Sex-Sorted Boar Sperm - An Update on Related Production Methods. *Reproduction in Domestic Animals*, **2015**, 50, 56-60.
10. Rehbock, C.; Jakobi, J.; **Gamrad, L.**; Van der Meer, S.; Tiedemann, D.; Taylor, U.; Kues, W.; Rath, D.; Barcikowski, S.: Current state of laser synthesis of metal and

- alloy nanoparticles as ligand-free reference materials for nano-toxicological assays. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, **2014**, 5, 1523-1541.
11. Taylor, U.; Garrels, W.; Barchanski, A.; Peterson, S.; Sajti, L.; Lucas-Hahn, A.; **Gamrad, L.**; Baulain, U.; Klein, S.; Kues, W. A.; Barcikowski, S.; Rath, D.: Injection of ligand-free gold and silver nanoparticles into murine embryos does not impact pre-implantation development. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, **2014**, 5, 677-688.
 12. Rehbock, C.; Merk, V.; **Gamrad, L.**; Streubel, R.; Barcikowski, S.: Size control of laser-fabricated surfactant-free gold nanoparticles with highly diluted electrolytes and their subsequent bioconjugation. *Physical Chemistry Chemical Physics*, **2013**, 15, 3057-3067.
 13. Taylor, U.; Barchanski, A.; Petersen, S.; Kues, W. A.; Baulain, U.; **Gamrad, L.**; Sajti, L.; Barcikowski, S.; Rath, D.: Gold nanoparticles interfere with sperm functionality by membrane adsorption without penetration. *Nanotoxicology*, **2013**, 8, 118-127.

Wissenschaftliche Vorträge als Erstautor

(* = Vortragender)

1. **Gamrad, L.***; Rehbock, C.; Barcikowski, S.; Krawinkel, J.; Tumursukh, B.; Heisterkamp, A.: Design of Nanoparticle-peptide conjugates as a model system for in vitro bioapplications. *CBB 2015 (Crossing Biological Barriers-Advances in Nanocarrier Design for Targeted Drug Delivery)*. Dresden, Deutschland, **09. - 11. November 2015**.
2. **Gamrad, L.***; Ziefuß, A.; Rehbock, C.; Taylor, U.; Mancini, R.; Rath, D.; Barcikowski, S.: Design of bivalent gold nanoparticle-oligonucleotide-peptide conjugates for efficient sperm sorting. *CENIDE NanoBio Workshop*. Essen, Deutschland, **12. März 2015**.
3. **Gamrad, L.***; Rehbock, C.; Krawinkel, J.; Tumursukh, B.; Heisterkamp, A.; Barcikowski, S.: Nanoparticle-peptide conjugates as model system for in vitro bioapplications. *CENIDE Nanobiophotonics Symposium 2014*. Essen, Deutschland, **11. März 2015**.
4. **Gamrad, L.***; Mancini, R.; Taylor, U.; Kues, W.; Rath, D.; Barcikowski, S.: Interference and binding of gold nanoparticle conjugates with Y-Chromosome bearing Spermatozoa. SPP1313 (Bio-Nano-Responses). Hotel "Esperanto", Fulda, Deutschland, **03. - 05. März 2014**. (Rapid-Fire-Vortrag)
5. **Gamrad, L.***; Ziefuß, A.; Rehbock, C.; Taylor, U.; Mancini, R.; Rath, D.; Barcikowski, S.: Design of bivalent gold nanoparticle-oligonucleotide-peptide conjugates for duplex and triplex hybridization. *SPIE Photonics West BIOS 2014*. San Francisco, USA, **01. - 06. Februar 2014**.
6. **Gamrad, L.***; Rehbock, C.; Barcikowski, S.: Laser generation of small monodisperse gold nanoparticles in saline solution independent from ligands. *LAMP 2013*. Niigata, Japan, **23. - 26. Juli 2013**.

Wissenschaftliche Vorträge als Koautor

(* = Vortragender)

7. Barcikowski, S.; **Gamrad, L.**; Rehbock, C. & Hansen, W.: Stabilizer-free gold nanoparticle bioconjugates as efficient transfection agents in regulatory T cells. *Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biomaterialien 2016*, Aachen, Deutschland, **29.09. – 01.10.2016**.
8. Rehbock, C.*; Jakobi, J.; **Gamrad, L.**; Van der Meer, S.; Tiedemann, D.; Taylor, U.; Kues, W.; Rath, D. & Barcikowski, S.: Ligand-free alloy nanoparticles for applications in nano-toxicological assays. *OMICS International Conference (Nanotechnology Congress and Expo)*. Frankfurt, Deutschland. **11. - 13. August 2015**.
9. Klein, S.*; **Gamrad, L.**; Barcikowski, S. & Rath, D.: Distribution of gold nanoparticles and clusters on bovine sperm after in vitro co-incubation. *FOCUS ON MICROSCOPY 2015*. Göttingen, Deutschland. **29. März - 01. April 2015**.
10. Barcikowski, S.*; Rehbock, C.; Jakobi, J.; **Gamrad, L.**; Van der Meer, S.; Tiedemann, D.; Taylor, U.; Kues, W. & Rath, D.: Current State on Laser Synthesis of Metal and Alloy Nanoparticles, Qualified as Ligand-Free Reference Materials for Nano-Toxicological Assays. *LPM 2014*. Vilnius, Litauen, **17. - 20. Juni 2014**.
11. Rehbock, C.*; Merk, V.; **Gamrad, L.**; Jakobi, J.; Tiedemann, D.; Taylor, U.; Kues, W.; Rath, D. & Barcikowski, S.: Biocompatible ligand-free gold and alloy nanoparticles for toxicological assays. *SPIE Photonics West BIOS 2014*, San Francisco, USA, **01. - 06. Februar 2014**.
12. Rehbock, C.*; Merk, V.; **Gamrad, L.**; Tiedemann, D.; Taylor, U.; Kues, W.; Rath, D. & Barcikowski, S.: Ligand-free metal and alloy nanoparticles and their application in reproduction biology. *Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biomaterialien 2013*. Erlangen, Deutschland, **26. - 28. September 2013**.
13. Rehbock, C.*; Merk, V.; **Gamrad, L.** & Barcikowski, S.: Highly diluted electrolytes allow ion-specific stabilization of curved ligand-free gold-water interfaces. *46th Biennial Meeting of the Colloid Society "Morphological Transformations and Responses in Colloidal Systems"*. Paderborn, Deutschland, **23. – 25. September 2013**.
14. Taylor, U.*; Rath, D.; Kues, W.; Barcikowski, S.; **Gamrad, L.**; Werner, D. & Mancini, R.: Specific nano-targeting of Y-chromosome bearing spermatozoa. *Reproduction in Domestic Animals*, Bologna, Italien, **12. - 14. September 2013**.
15. Rehbock, C.*; Merk, V.; **Gamrad, L.** & Barcikowski, S.: Application of additive-free gold nanoparticles for toxicity assays in reproduction biology. *BioMAT (European Symposium on Biomaterials and Related Areas)*. Weimar, Deutschland, **23. - 24. April 2013**.
16. Rehbock, C.*; Merk, V.; **Gamrad, L.**; Taylor, U.; Kues, W.; Rath, D. & Barcikowski, S.: Additive-free gold nanoparticles as toxicity reference materials in reproduction biology. *SPIE Photonics West 2013*. San Francisco, USA, **02. - 07. Februar 2013**.

17. Rehbock, C.*; Werner, D.; **Gamrad, L.**; Taylor, A.; Kues, W.; Rath, D. & Barcikowski, S.: Bioconjugated gold nanomarkers for imaging in cytology and reproduction biology. *SPIE Photonics West 2013*. San Francisco, USA, **02. - 07. Februar 2013**.
18. Rehbock, C.*; Werner, D.; **Gamrad, L.**; Taylor, A.; Kues, W.; Rath, D. & Barcikowski, S.: Conjugated gold nanoparticles as selective imaging tools in cell biology. *SPIE Photonics West 2013*. San Francisco, USA, **02. - 07. Februar 2013**.
19. Rehbock, C.*; **Gamrad, L.**; Taylor, U.; Kues, W.; Rath, D. & Barcikowski, S.: Nano-Particle Reference Materials for Cytotoxicity Assays without Sideeffects. *XXXIX Congress of the European Society for Artificial Organs*. Rostock, Deutschland, **26. - 29. September 2012**.
20. Rehbock, C.*; **Gamrad, L.**; Wagener, P. & Barcikowski, S.: Laser fabrication of Au bioconjugates by delayed conjugation in liquid flow. *13th International Symposium on Laser Precision Microfabrication (LPM2012)*. Washington, DC, USA, **12. - 15. Juni 2012**.
21. Rehbock, C.*; **Gamrad, L.** & Barcikowski, S.: Size control and protein conjugation of ligand-free, laser-fabricated gold nanoparticles by delayed conjugation in liquid flow. *ANGEL 2012 (2nd Conference on Advanced Nanoparticle Generation and Excitation by Lasers in Liquids)*. Taormina, Italien, **22. - 24. Mai 2012**.
22. Rehbock, C.*; **Gamrad, L.** & Barcikowski, S.: Protein conjugation of ligand-free gold nanoparticles by laser ablation in liquid flow. *Nanoscience with Nanocrystals, International Conference (NaNax)*. Furingola, Spanien, **07. - 11. Mai 2012**.

Wissenschaftliche Posterbeiträge als Erstautor

(* = Vorstellender)

1. **Gamrad, L.***; Rehbock, C.; Krawinkel, J.; Tumursukh, B.; Heisterkamp, A.; Barcikowski, S.: Preparation strategy of nanoparticle-peptide conjugates as model system for *in vitro* bioapplications. *6th International Colloids Conference*. Berlin, Deutschland, **19. - 22. Juni 2016**.
2. **Gamrad, L.***; Streich, C.; Rehbock, C.; Akkari, L.; Schrader, T.; Hansen, W.; Barcikowski, S.: Functional laser-generated gold-nano-conjugates for in vitro bioapplications. *ANGEL 2016 (4th Conference on Advanced Nanoparticle Generation and Excitation by Lasers in Liquids)*. Essen, Deutschland, **09. - 13. Mai 2016**.
3. **Gamrad, L.***; Ziefuß, A.; Rehbock, C.; Taylor, U.; Mancini, R.; Rath, D.; Barcikowski, S.: Gold nanoparticle-oligonucleotide-peptide conjugates for specific sperm targeting. *NanoBioApp 2015 (Latest Advances on Nanomaterials for Biomedical Applications)*. Casa de la Convalecencia, Barcelona, Spanien, **21. - 23. September 2015**.

4. **Gamrad, L.***; Ziefuß, A.; Rehbock, C.; Taylor, U.; Mancini, R.; Rath, D.; Barcikowski, S.: Design of bivalent gold nanoparticle-oligonucleotide-peptide conjugates for precise sperm targeting. *10th International Congress & Exhibition on Nanobiotechnology (NanoBioEurope)*. Münster, Deutschland, **02. - 04. Juni 2014**.
5. **Gamrad, L.**; Rehbock, C.*; Krawinkel, J.; Tumursukh, B.; Heisterkamp, A.; Barcikowski, S.: Precise and quantitative charge balancing for the preparation of nanoparticle-peptide conjugates with laser-generated gold nanoparticles as model system for in vitro bioapplications. *ANGEL 2014 (3rd Conference on Advanced Nanoparticle Generation and Excitation by Lasers in Liquids)*. Matsuyama, Japan, **19. - 21. Mai 2014**.
6. **Gamrad, L.***; Mancini, R.; Taylor, U.; Kues, W.; Rath, D.; Barcikowski, S.: Interference and binding of gold nanoparticle conjugates with Y-Chromosome bearing Spermatozoa. *SPP1313 (Bio-Nano-Responses)*. Hotel "Esperanto", Fulda, Deutschland, **03. - 05. März 2014**.
7. **Gamrad, L.***; Rehbock, C.; Krawinkel, J.; Tumursukh, B.; Heisterkamp, A.; Barcikowski, S.: Design of gold nanoparticle-peptide conjugates with optimized ligand loads and stabilities for in vitro bioapplications. *BioMAT (European Symposium on Biomaterials and Related Areas)*. Weimar, Deutschland, **23. - 24. April 2013**.
8. Million, N.*; **Gamrad, L.***; Nachev, P.; Pich, A.; Barcikowski, S.: Conjugation of nanoparticles by laser ablation in aqueous monomer solution for biomedical application. *9. Zsigmondy-Kolloquium*. Essen, Deutschland, **06. - 08. März 2013**.

Wissenschaftliche Posterbeiträge als Koautor

(* = Vorstellender)

9. Jakobi, J.*; Rehbock, C.; **Gamrad, L.**; Van der Meer, S.; Tiedemann, D.; Taylor, U.; Kues, W.; Rath, D. & Barcikowski, S.: Pure alloy nanoparticles mimicking implant abrasion for toxicological assays. *SPP1313 (Bio-Nano-Responses)*. Hotel "Esperanto", Fulda, Deutschland, **03. - 05. März 2014**.
10. Rehbock, C.*; Merk, V.; **Gamrad, L.**; Taylor, U.; Kues, W.; Rath, D. & Barcikowski, S.: Additive-free gold nanoparticles as toxicity reference materials synthesized under non-equilibrium conditions. *19th Ostwald-Kolloquium*. Berlin, Deutschland, **20. - 21. September 2012**.